

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Z88p Zortéa Júnior, Alberto João.
Proposição de estabelecimento dos protocolos de coleta de tecido ósseo, cultura primária e linhagem celular, e de caracterização de células humanas semelhantes a osteoblastos, oriundas da mandíbula / Alberto João Zortéa Junior. – Florianópolis, 2006.
101f. : il.

Orientador: Ricardo de Souza Magini.
Co-orientador: Cláudia Maria Oliveira Simões.
Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2006.
Inclui bibliografia.

1. Implantes dentários osseointegrados – Teses. 2. Células osteoblásticas - semelhantes – Teses. 3. Engenharia tecidual – Teses. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Simões, Cláudia Maria Oliveira. III Universidade Federal de Santa Catarina. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU 616.314-089.843

ALBERTO JOÃO ZORTÉA JUNIOR

**PROPOSIÇÃO DE ESTABELECIMENTO DOS PROTOCOLOS
DE COLETA DE TECIDO ÓSSEO, CULTURA PRIMÁRIA E
LINHAGEM CELULAR, E DE CARACTERIZAÇÃO DE
CÉLULAS HUMANAS SEMELHANTES A OSTEOLASTOS,
ORIUNDAS DA MANDÍBULA**

Florianópolis
2006

ALBERTO JOÃO ZORTÉA JUNIOR

**PROPOSIÇÃO DE ESTABELECIMENTO DOS PROTOCOLOS
DE COLETA DE TECIDO ÓSSEO, CULTURA PRIMÁRIA E
LINHAGEM CELULAR, E DE CARACTERIZAÇÃO DE
CÉLULAS HUMANAS SEMELHANTES A OSTEOLASTOS,
ORIUNDAS DA MANDÍBULA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Doutorado Acadêmico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Odontologia, área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Co-orientadora: Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis
2006

ALBERTO JOÃO ZORTÉA JUNIOR

**PROPOSIÇÃO DE ESTABELECIMENTO DOS PROTOCOLOS DE
COLETA DE TECIDO ÓSSEO, CULTURA PRIMÁRIA E LINHAGEM
CELULAR, E DE CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS HUMANAS
SEMELHANTES A OSTEOLASTOS, ORIUNDAS DA MANDÍBULA**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA – OPÇÃO IMPLANTODONTIA e aprovada na forma final pelo programa de Pós-graduação em Odontologia, Doutorado Acadêmico, do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 23 de Fevereiro de 2006

Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Universidade Federal de Santa Catarina

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador – CCS/UFSC

Profª. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
Co-orientadora - CIF/CCS/UFSC

Profª. Dra. Andréa Gonçalves Trentim
Membro - BEG/CCB/UFSC

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Membro - CCS-UFF

Profª. Dra. Fernanda Boabaid
Membro – CCS- UFSC

*Ao meu saudoso pai **Alberto João Zortéa**, que me ofereceu valiosos ensinamentos existenciais e humanísticos, essenciais na consolidação da minha personalidade.*

*À minha mãe **Maria Stella Barroso Zortéa**, pelas suas demonstrações de simplicidade, humildade, amor ao próximo e crença na eternidade.*

*À minha querida esposa **Graziela Urquiza Correa de Moraes Zortéa**: seus esforços têm sido valiosos na construção e manutenção da nossa unidade familiar...*

*Ao meu filho primogênito **Alberto João Zortéa Neto**, concebido em momento de muita harmonia e que tem mantido o nosso céu sempre iluminado.*

*À minha amável filha **Nicole Correa de Moraes Zortéa**: o perfume que tem exalado tem contagiado nossos corações...*

*Ao meu filho caçula **Giovanni Correa de Moraes Zortéa**, pelo seu brilho e equilíbrio, conquistando todos nós que estamos ao seu redor.*

AGRADECIMENTOS

Professor **Ricardo de Souza Magini**: meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de participar deste programa de doutorado. Suas idéias, seus projetos, seu otimismo são contagiantes. Espero que continuemos a buscar caminhos, em conjunto, para que a Engenharia Tecidual se torne realidade na Implantodontia. Sua Visão foi fundamental para que tomasse minha Decisão de buscar alternativas na Bioengenharia!

Professor **Antônio Carlos Cardoso**, seus exemplos de segurança e determinação foram muito importantes nesta minha etapa de formação acadêmica. Você possibilitou, através da confiança dispensada, que o sonho de participar deste programa de Doutorado se tornasse realidade. Agradeço imensamente a oportunidade!

Ao Professor **Sérgio de Freitas**: você conseguiu me mostrar como podemos pensar em Ciência, com seriedade, competência e humildade. Seus ensinamentos farão parte da minha vida profissional, acadêmica e pessoal *ad infinitum*.

Professora **Cláudia Maria Oliveira Simões**: as portas da Cultura Celular foram abertas por você, através dos seus ensinamentos e confiança manifestada, quando disponibilizou o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC para que pudéssemos desenvolver este trabalho. Obrigado pelo que me ofereceu nesta importante etapa da minha vida!

Meus sinceros agradecimentos a todo o corpo docente, da área conexa e de concentração, do **Programa de Doutorado em Implantodontia**, pelos valiosos ensinamentos. Todos foram muito importantes neste meu processo de edificação.

Aos amigos do mestrado e doutorado do programa de Implantodontia **Dircelene, Cimara, Otávio, Adriana, Pontual, Nilo, Bianchini, Cleide, Aline, César, Magalhães, Raul, Hiron, China e Angélica**: foi muito bom ter convivido com vocês nestes quatro anos. Apreendi muito e fiz bons amigos. Obrigado pela oportunidade de conviver com vocês!

Ao mestre e amigo **Kávio Narciso de Castro**: nós conseguimos através da determinação, seriedade, confiança, amizade e companheirismo estabelecermos um elo de ligação, que contempla trabalho, família e amizade. Estes achados são muito importantes na nossa vida!

Ao mestre, doutorando e amigo **Gustavo dos Santos Coura**: nosso trabalho em conjunto gerou inúmeros resultados positivos, no campo profissional, acadêmico e

peçoal. As famílias **Zortéa, Coura e Santos** estão há muito tempo juntas, buscando a superação e oferecendo préstimos à quem precisar. Agradeço à Deus por possibilitar esse encontro!

Aos funcionários do **CEPID Miriam, Dolores e Gisele**, que através do apoio logístico possibilitam o bom andamento das atividades da Implantodontia. Agradeço de forma especial à funcionária do centro cirúrgico **Janete**, pela boa vontade e carinho dispensados.

Edson, Bira, Luciane, Edson, João, Gustavo, Fernando, Alemão (alunos da especialização em Implantodontia da UFSC): vocês foram participantes muito importantes neste trabalho. Muito obrigado!

Ao amigo **Bruno Melo**, irmão e companheiro em diversas frentes de trabalho.

Ao **Dr. Ricardo Passoni**, pelos préstimos profissionais e manifestações de amizade.

Agradeço a doutora **Fernanda Boubaid**, pelas demonstrações de amizade, competência e seriedade. O teu interesse pela ciência é um exemplo a ser seguido!

Agradeço a professora **Célia Regina Monte Berardi**, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia pelas orientações durante a execução desta pesquisa.

Aos alunos do programa de mestrado e doutorado em Biotecnologia e estagiários do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, pelas orientações e apoio logístico dispensado na execução desta pesquisa. Agradeço de forma especial à doutoranda **Luciane Savi** e a mestranda **Vanessa** pelo valioso auxílio na realização dos experimentos.

Agradeço a professora **Andréa Gonçalves Trentim** por ter disponibilizado o Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular para execução de alguns experimentos, de fundamental importância para realização deste trabalho.

Ao doutorando de Neurociências **Ricardo Castilho Garcez**, pelo apoio logístico na execução de alguns experimentos e orientação em diversas questões relacionadas à Biologia Celular e Molecular.

Aos funcionários do Implantare Londrina, **Dra. Carla, Dr. Osvaldo, Ana Paula, Karolyn, Alexandre, Tatiana, Silvana e Simone**: meu muito obrigado por não terem medido esforços para que chegássemos ao nosso objetivo. Agora vamos começar a disputar as finais dos campeonatos!

Agradeço de forma especial a TPD **Meire Cristiane Silvério** e **Sr. Noel da Silva Castro** pela garra, apoio logístico e cumplicidade!

Aos funcionários do Implantare Curitiba, **Dra. Ana Paula**, **Dra. Graziela**, **Emanuele** e **Karen**: estamos montando um time muito competente! Obrigado por acreditarem!

Agradeço a minha irmã **Patrícia** e minha sobrinha **Carla**; os obstáculos foram possíveis de serem suplantados por estarmos muito juntos, mais uma vez nesta vida! Vocês foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Serei eternamente grato pela forma como me apoiaram nesta empreitada!

Ao meu primo **Carlos**: Primo, os projetos que iniciamos há 20 anos atrás têm se mostrado difíceis, mas estamos conseguindo! Obrigado pela manifestação de irmandade durante esse período de realização do Doutorado!

Ao meu grande amigo e companheiro **Mário**: depois de 35 anos ainda nos mantemos amigos fiéis e grandes companheiros de caminhada.

Aos meus sogros **Lamartine** e **Neuza**: este aprendizado de superação que temos tido têm demonstrado o potencial que os seres humanos possuem!

Ao Amigo **Paulino**, pelos ensinamentos e energia positiva transmitida durante estes anos.

Ao **Suryavan Solar** e **Taita Pablo**, que juntos com os companheiros do Condor Blanco, em momento oportuno vieram me trazer luz e sabedoria.

Aos **irmãos do Aerópago**, que monitorados pelo Grande Arquiteto do Universo, sempre se mantiveram ao meu lado durante esta trajetória.

Aos professores da disciplina de Periodontia e Implantodontia da Unopar, professores **Dr. Mario Genta Cordioli** e **Paulo Roberto Franzon Filho**. Ao professor **Bruno Giordani**, que reforçou a disciplina durante o período que estive trabalhando neste projeto.

Aos professores do Curso de especialização em Implantodontia da Unopar: **Eneida**, **Gustavo**, **Karina**, **Clóvis**, **Paulo** e **Carlos**. Obrigado pela força!

Ao amigo e sempre mestre **Marcos Frossard**, pelo incontestável exemplo de dignidade, profissionalismo e atividade acadêmica.

Aos professores **Luiz Walter**, **Fernão** e **Celeste**, que juntos com a Universidade do Norte do Paraná, possibilitaram a realização deste programa de Doutorado.

As bibliotecárias da Unopar, **Justymara Fernanda dos Santos Serrano** e **Terezinha de Jesus Fokama Gondo**, pelos grandes préstimos prestados durante a pesquisa bibliográfica para a execução deste trabalho.

Ao prof. **Dr. Carlos Nozawa**, docente da Universidade Estadual de Londrina, por ter me disponibilizado vários recursos que foram fundamentais para a evolução do trabalho, além do incentivo e preciosas orientações acadêmicas, com muita sabedoria e humanidade.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho. Desculpem-me pela omissão, caso tenha esquecido de citá-lo.

A **Deus**, por ter me apoiado neste momento especial da minha Existência!

A realização deste trabalho foi possível graças ao empenho de várias frentes de trabalho, que me apoiaram no campo profissional, pessoal, acadêmico e logístico. Este é um excelente exemplo da força retirada da união: **A UNIÃO FAZ A FORÇA! MUITO OBRIGADO A TODOS!**

A união faz a força

Juntos somos mais fortes. O senso comum é enfático quanto a isso, mas como explicar esse fato, para que não restem dúvidas? Vamos começar pela ciência: ela nos conta que a vida surgiu na Terra há cerca de 3 bilhões de anos e que o primeiro ser vivo não passava de um complexo de proteínas envolto por uma membrana, dentro da qual o milagre da vida se manifestou pelo surgimento dos primeiros ácidos nucleicos, precursores do DNA, a principal marca química da vida.

O corpo dos primeiros seres era, portanto, composto por apenas uma célula, como até hoje muitos são – os protozoários, as bactérias, certas algas. Entretanto, a partir desses seres unicelulares, começou a busca da organização, o que significou principalmente uma coisa: a formação de colônias. Inicialmente muito simples, isomorfas, com todos os seres iguais, realizando todas as tarefas necessárias à sobrevivência de cada um. Depois, as mais complexas, heteromorfas, nas quais já começa a haver divisão de tarefas entre os diversos membros, ficando um tipo responsável pela obtenção do alimento, outro pela digestão, outro pela reprodução e assim por diante.

A partir dessa divisão dos trabalhos, os pequenos indivíduos não podiam mais se separar. Estava em curso o surgimento dos primeiros seres pluricelulares, resultados da aglutinação e da especialização dos unicelulares. A chance de vitória, a partir dessa estratégia, aumentou consideravelmente, e a evolução não parou mais, com o surgimento de espécies cada vez mais especializadas e complexas.

Até que surgiram os vertebrados, entre eles o ser humano, o animal pensante. E este, apesar de sua sofisticação orgânica, manteve um comportamento igual ao daquela primeira célula. Aliás, isto é o que somos, células que interagem para formar um tecido – a sociedade. Embora tenhamos nossos próprios pensamentos e vontades, dependemos uns dos outros para sobreviver, como as células que começaram a viver amontoadas. Em outras palavras, retiramos nossa força dos outros, do conjunto, do coletivo. O macro imita o micro e, em todos os níveis da vida, não há a menor dúvida, é a união que faz a força.

Eugênio Mussak

ZORTÉA JUNIOR., Alberto João. **Proposição de estabelecimento dos protocolos de coleta de tecido ósseo, cultura primária e linhagem celular, e de caracterização de células humanas semelhantes a osteoblastos, oriundas da mandíbula.** 2006. 101f. Tese (Doutorado em Odontologia – Opção Implantodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

O êxito dos implantes osseointegrados, utilizados na odontologia, depende do efeito e da correlação entre diversas variáveis, sendo imprescindível que o leito receptor ósseo apresente estrutura suficiente para recebê-los. Em algumas situações é necessária a reconstrução da arquitetura óssea. O tecido ósseo autógeno oriundo da cavidade oral apresenta-se como fonte de material de transplantes padrão-ouro para utilização nesses procedimentos. Modelos de investigação científica, com cultura celular de osteoblastos, também têm sido amplamente utilizados em testes e desenvolvimentos de novos biomateriais, na confirmação e no desenvolvimento de protocolos de regeneração óssea guiada e terapia celular aplicados à implantodontia. A grande maioria desses estudos utiliza células oriundas de tecidos fetais ou neonatais de animais experimentais e células ósseas humanas isoladas de locais não associados com a cavidade oral. Contudo, existem diferenças morfológicas, fisiológicas e fenotípicas entre as espécies, entre adultos e neonatais e diferentes regiões de uma mesma espécie, com limitações óbvias na utilização desses modelos para aplicações em implantodontia. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um protocolo viável de coleta de tecido ósseo, utilizando o sistema de fresas do sistema de implantes Bycon™ (Boston, USA) estabelecimento de cultura primária, linhagem celular e caracterização de células osteoblásticas-semelhantes humanas oriundas da cavidade oral, otimizando procedimentos de biópsia óssea para coleta de material de enxerto autógeno, que estejam previstos para execução de outros procedimentos regenerativos. Aspecto morfológico, produção de mineralizações (coloração de Von Kossa), proliferação e caracterização fenotípica através de Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) para Osteocalcina (OCN), Osteopontina (OPN), Fosfatase Alcalina (ALP) e Colágeno tipo I (Col I) foram analisadas, conforme protocolos estabelecidos para caracterização deste tipo celular. Pode-se verificar que as células osteoblásticas-semelhantes expressaram OCN, OPN, ALP e COL I e formaram nódulos de mineralização. Os resultados encontrados, nesta pesquisa, quando analisados em conjunto, demonstram que as células cultivadas apresentaram características morfológicas e fenotípicas de osteoblastos em cultura. O material autógeno obtido tanto pôde ser utilizado nos procedimentos regenerativos previstos, quanto no estabelecimento da cultura primária e linhagem celular osteoblástica-semelhante.

Palavras-chave: Cultura primária. Células osteoblásticas-semelhantes. Caracterização fenotípica. Coleta óssea. Engenharia tecidual.

ZORTÉA JUNIOR., Alberto João. **Proposition of protocols of bone tissue harvesting and human osteoblast-like primary culture establishment, characterization and cellular line from mandible.**2006. 101f. Tese (Doutorado em Odontologia – Opção Implantodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The outcome of dental implants depends on the effect and the correlation among several variables, and it is imperative that the receptor's bone site presents sufficient structure to support the implant. In some situations the reconstruction of the bone architecture is necessary and autogenous bone graft harvested from oral sites are the gold standard for this procedures. Scientific investigations based on osteoblasts culture are widely used in novel biomaterials and bone regeneration protocols tests and development and cellular therapy applied to implantology. Most of these studies use cells from fetal tissues or neonates experimental animals and human bone cells from oral cavity non associated sites. However, there are morphological, functional and phenotypic differences among species, adults and neonates and different regions in the same species, which impose certain limitations on the usefulness of these models in dental implants applications. The objective of this research was to develop a bone tissue harvesting viable protocol, utilizing Bicon™ (Boston, USA) implant drills, osteoblast-like primary culture establishment and characterization and cellular line from oral cavity site, optimizing bone harvesting proceedings to autogenous graft that be planned to another in oral cavity reconstructive procedures. Morphological structure, mineralization production by means of Von Kossa staining, proliferation and phenotypic characterization by Reverse Transcriptase of Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) to Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN), Alkaline Phosphatase (ALP) and Type I Collagen (COL I) was analyzed, according establishments protocols for this cellular type characterization. The osteoblast-like cells demonstrated OCN, OPN, ALP and ALP expression and ability to produce mineralization nodules. The results found in this study, when analyzed in set, demonstrated that the cultured cells presented osteoblast in culture morphological and phenotypic characteristics. It was possible to utilize the harvesting autogenous bone in the reconstructive procedures and in the osteoblast-like primary culture and line establishment.

Key words: Primary culture. Osteoblast-like cells. Phenotypic characterization. Bone harvesting. Tissue engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Coleta de tecido ósseo da região da sínfise da mandíbula	52
Figura 02- Explantes sendo colocados nas garrafas de cultura celular	52
Figura 03 - Seio maxilar preparado para receber transplante de osso autógeno	52
Figura 04 - Transplante de osso autógeno realizado no seio maxilar.....	53
Figura 05 - Células após 02 dias em cultura primária (100 X).....	53
Figura 06 - Células osteoblásticas-semelhantes apresentando morfologia típica de osteoblastos em cultura (100X).....	53
Figura 07 - Estágio de subconfluência celular atingido entre 25-40 dias (100X).....	53
Figura 08 – Gel de agarose a 2% dos produtos da reação de RT-PCR de células osteoblásticas-semelhantes cultivadas (bandas 1, 2, 3 e 4) e controle positivo (bandas 5, 6, 7 e 8).54	
Figura 09 - Gel de agarose a 2% dos produtos da reação de RT-PCR de células osteoblásticas-semelhantes e controle negativo	54
Figura 10 - Nódulos de mineralização evidenciados através de coloração de Von Kossa (100X).....	54
Figura 11 - Nódulo de mineralização evidenciados através de coloração de Von Kossa (400X)	

SUMÁRIO

RESUMO	0
ABSTRACT	0
LISTA DE FIGURAS	0
SUMÁRIO.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
1 ARTIGO	29
1.1 RESUMO	29
1.2 ABSTRACT.....	29
1.3 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA	33
2.2 CULTIVO PRIMÁRIO E ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM CELULAR.....	34
2.3 ACOMPANHAMENTO DA PROLIFERAÇÃO E DO ASPECTO MORFOLÓGICO CELULAR.....	36
2.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA LINHAGEM ESTABELECID.....	36
2.4.1 Extração de RNAs totais.....	36
2.4.2 Síntese do cDNA – transcrição reversa.....	37
2.4.3 Reação do RT-PCR.....	37
2.5 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO.....	37
3 RESULTADOS	39
3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA.....	39
3.1.1 Obtenção da Cultura Primária, Acompanhamento da Proliferação e do Aspecto Morfológico Celular e Estabelecimento de Linhagem Celular	39
3.1.2 Avaliação Fenotípica das Células Cultivadas.....	40
3.1.3 Ensaio de Mineralização.....	40
4 DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	47
ARTICLE	56
ABSTRACT:	56
INTRODUCTION	57
MATERIAL AND METHODS	58
RESULTS.....	62
DISCUSSION.....	64
REFERÊNCIAS	69

ILUSTRATIONS AND TABLE	74
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	78
ANEXOS E APÊNDICES	83
METODOLOGIA EXPANDIDA	84
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	95
RELAÇÃO DE OUTROS TRABALHOS PUBLICADOS OU ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O DOUTORADO	98

INTRODUÇÃO

Os implantes osseointegrados têm sido amplamente utilizados na Odontologia, como elemento auxiliar nas reabilitações de áreas edêntulas, apresentando alto índice de previsibilidade. O êxito de tais implantes depende do efeito e da correlação entre as diversas variáveis que compõem uma equação que compreende a biocompatibilidade do material do implante, a natureza macroscópica e microscópica de sua superfície, o estado do leito do implante, a técnica cirúrgica *per se*, a cicatrização sem perturbações e o desenho da prótese instalada sobre o implante. (ALBREKTSSON et al., 1981).

O leito receptor ósseo deve ter estrutura suficiente para receber o implante osseointegrado indicado para a situação, sendo necessária, em algumas áreas, a reconstrução da arquitetura óssea, com utilização de biomateriais, enxertos autógenos e alógenos, embora restrições em todas estas técnicas existam. Tais restrições incluem morbidade do sítio doador e escassez de área doadora para enxertos autógenos, barreiras imunológicas e o risco de transmissão de doenças infecciosas e de reabsorção óssea imprevisível após a cirurgia para os enxertos alógenos. (BINDERMAN; FIN, 1990; DAMIEN; FREIHOFFER, 1992; HOPPENREIJS; NIJDAM; ASSAEL, 2003; PARSON, 1991). Apesar das limitações, o método mais comum e que apresenta melhores resultados, utilizado em larga escala na Implantodontia, é a remoção de tecido ósseo autógeno de uma determinada região e implantação do enxerto ósseo autógeno fresco na área receptora. (ADELL et al., 1990). A principal vantagem nesta modalidade de enxerto em relação aos outros modelos encontra-se na presença de células vivas, fatores de crescimento e citocinas. (MEYER; JOOS; WIESMANN, 2004). As limitações citadas resultaram no desenvolvimento de pesquisas e nos estabelecimentos de protocolos no campo da Engenharia Tecidual, em que a cultura primária de células ósseas autógenas, a amplificação destas e o transplante para a área reconstruída são uma das maiores promessas da aplicação clínica da Bioengenharia Óssea na cavidade oral, pois elimina a problemática da morbidade do sítio doador para enxertos autólogos, a imunogenicidade dos enxertos alógenos e o afrouxamento dos implantes aloplásticos. (VACANTI, 1998; VACANTI; CHARLES; BONASSAR, 1999).

A cultura de tecidos desenvolveu-se no início do século passado e a técnica de cultura celular primária, a partir de explantes, foi o método original desenvolvido por Harrison (1907) e Carrel (1912) como um método para o estudo do comportamento de células animais, com ausência de variações sistêmicas, que podem acontecer em um estado fisiológico normal ou em condições de estresse de um experimento. Como o próprio nome

indica, a técnica foi elaborada, primeiramente, com fragmentos desagregados de tecido, e o crescimento foi restrito à migração de células do tecido, com ocasionais mitoses e crescimento. O termo cultura de tecidos inclui cultura de órgãos e cultura de células. A cultura de órgãos implica numa cultura tridimensional de tecidos desagregados, que conservam algumas ou todas as características histológicas do tecido *in vivo*. A cultura de células refere-se às culturas derivadas de células dispersas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular estabelecida por desagregação enzimática, mecânica ou química. O termo cultura histotípica (cultura tridimensional que tenta manter, através da proliferação celular e da formação de multicamadas ou através de reagregação, a estrutura tecido-semelhante) refere-se às células associadas numa estrutura tridimensional, como por exemplo, a infiltração de células em uma matriz tridimensional como o gel de colágeno. (FRESHNEY, 1999).

Autores como McAteer e Davis (1996) e Freshney (1999) consideram como cultura primária culturas derivadas de tecidos dissociados ou de fragmentos de tecidos e como linhagem uma cultura primária que seja subcultivada; os termos linhagem finita ou contínua devem ser utilizados somente quando essas propriedades tiverem sido determinadas. O termo linhagem celular não implica em homogeneidade ou no grau de caracterização da cultura.

A demonstração de que tumores humanos poderiam também dar origem a linhagens celulares contínuas, como as linhagens do tipo celular HeLa (GEY; COFFMAN; KUBICEK, 1952), aumentou, ainda mais, o interesse na cultura de tecidos humanos. As estratégias da engenharia tecidual através do cultivo celular humano para aplicação clínica estão sendo desenvolvidas em diferentes campos da medicina, para reposição de pele, cartilagem, osso, componentes cardiovasculares e pancreas. (MCALLISTER et al., 1998). Atualmente, concomitante aos avanços associados na medicina de transplantes, genética, engenharia biomédica e na engenharia de órgãos, a engenharia tecidual oferece a possibilidade de regeneração verdadeira, essencial para as estruturas humanas danificadas. (ASSAEL, 2003).

Nos décadas de 1950, 1960 e 1970, um grande número de estudos experimentais sobre efeitos adversos causados pelos materiais dentários utilizados na prática odontológica foram publicados, em paralelo com o desenvolvimento de novos materiais resinosos e técnicas de tratamento inovadoras, tal qual os motores de ar de alta velocidade. Além disso, nesse período, duas principais correntes na literatura odontológica podem ser distinguidas. Uma corrente conduzia estudos animais, em que os materiais eram aplicados e utilizados em pacientes e as reações teciduais eram observadas através de técnicas

histológicas. As técnicas experimentais envolvendo modelos animais, principalmente, primatas não-humanos, foram melhoradas pela padronização das técnicas histológicas e dos procedimentos de avaliação. (BAUME; HOLZ; FIORE DONNO; 1972; KLÖTZER; LANGELAND, 1973; LANGELAND et al., 1966). A segunda corrente concentrou-se na avaliação de propriedades biológicas básicas, como por exemplo, na utilização de técnicas de cultura celular. Tais métodos tornaram-se disponíveis para a pesquisa odontológica durante a década de 1950, no Japão. (KAWAHARA; SHIOTA; YAMAKAWA, 1955). Falta a referência!!! As culturas de células têm sido progressivamente utilizadas na análise dos aspectos biológicos dos materiais dentários. Estas avaliações estão sendo realizadas de forma mais ampla, não ficando restritas aos efeitos adversos, mas avaliando também as interações positivas com o tecido vivo. Um exemplo é a incorporação de sinais moleculares dentro de materiais para estimular a aposição dentinária ou o crescimento ósseo. (DECUP et al., 2000).

Outra tendência é a substituição dos testes animais pelos métodos de cultura celular *in vitro*. As aparentes discrepâncias entre os resultados dos testes *in vitro* e dos estudos em animais e humanos estão sendo superados pelos novos desenhos dos testes. (SCHMALZ, 2002). Através da engenharia genética, células podem ser construídas de forma que atendam aos requisitos para testes padronizados e que, por outro lado, melhor representem o objetivo do tecido *in vivo*. (THONEMANN; SCHMALZ, 2000). Testes padronizados são atualmente baseados nos equipamentos comercialmente disponíveis, que podem ser combinados com culturas de células tridimensionais, para simular o fluxo sanguíneo, através de um meio de perfusão constante. (SCHMALZ, 2002; SCHUSTER et al., 2001).

A tecnologia de cultura de tecidos foi adotada na medicina em muitas situações rotineiras. A análise cromossômica de células derivadas do útero pode revelar desordens genéticas na criança que ainda está por nascer; infecções virais podem ser avaliadas quantitativamente e qualitativamente em cultura de células apropriadas do hospedeiro; efeitos tóxicos de produtos farmacêuticos e poluentes ambientais podem ser avaliados em ensaios *in vitro*. O uso da cultura de tecidos vem aumentando, consideravelmente, e suas aplicações estão agora sendo divulgadas de forma mais ampla, podendo ser citado como exemplo o projeto em 2006 do Instituto do Milênio de Terapia Tecidual do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT).

Engenharia tecidual, termo definido em 1987, é uma ciência multidisciplinar, na qual princípios e métodos da engenharia unem-se àqueles das ciências biológicas, para o estudo das relações entre estrutura e função em tecidos e órgãos, em estados normais ou patológicos, assim como para o desenvolvimento de substitutos biológicos que

possam restaurar, manter ou melhorar a função de tecidos ou órgãos. (SKALAK; FOX, 1988).

A engenharia tecidual pode ser definida como o desenvolvimento e a manipulação de moléculas de crescimento, células, tecidos, ou órgãos, para substituir ou suportar a função de partes do corpo defeituosas ou injuriadas. Os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão, portanto, baseados na tríade células/mediadores/carreadores, onde células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células-tronco, entre outras) são cultivadas e mediadores solúveis, como fatores de crescimento ou de morfogênese, como as BMPS são adicionados, sendo os mesmos combinados a matrizes (arcabouços) confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos, atuando como carreadores para células ou proteínas. (UEDA et al., 2001).

O tecido ósseo é um tecido complexo que contém, pelo menos, quatro diferentes tipos celulares da linhagem osteoblástica: osteoblastos ativos (células cuboidais, polarizadas, ricas em organelas envolvidas na síntese e secreção de matriz de proteínas); osteócitos (osteoblasto com baixa atividade metabólica que foi envolvido na matriz óssea durante a sua formação e sepultado na lacuna); células ósseas de superfície (células osteoblásticas que não são sepultadas na lacuna e perdem sua proeminente função de síntese, estas células recobrem a maioria da superfície óssea nos ossos maduros) e pré-osteoblastos (células proliferativas com capacidade osteogênica). Adicionalmente, o tecido ósseo contém células de uma linhagem distinta, o osteoclasto. A complexa estrutura do tecido ósseo, a heterogeneidade dos tipos celulares, bem como a interconexão da matriz extracelular e da fração mineral, tornam o tecido ósseo uma difícil região para extrair células e estudá-las em nível molecular e celular. (GALLAGHER, 2003).

Técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas para investigar os papéis dos osteoblastos na formação e reabsorção óssea, e a cultura de células ósseas humanas é um modelo muito utilizado na investigação da biologia óssea. (GARTLAND et al., 2005). Contudo, várias culturas de osteoblastos têm sido realizadas através de digestão enzimática de tecidos fetais ou neonatais, pouco mineralizados, com alta celularidade, de animais experimentais, tendo sido evitado osso humano maduro e mineralizado. (KASPERK et al., 1995). Os pesquisadores utilizam o cultivo de osteoblastos para investigar diversos aspectos: a bioquímica básica e a fisiologia da formação óssea, as bases celulares e moleculares das doenças ósseas humanas e a participação dessas células na regulação da reabsorção óssea. Utilizam, ainda, tal cultivo para testar e desenvolver agentes terapêuticos potenciais, assim como novos biomateriais e aplicar a terapia celular e a engenharia tecidual para transplante ósseo. (GARTLAND et al., 2005). Embora esses estudos tenham sido importantes para o

conhecimento da biologia celular óssea, eles apresentavam obstáculos óbvios, devido às diferenças na fisiologia óssea entre as espécies, e também entre adultos e neonatais de uma mesma espécie. Além disso, linhagens celulares ósseas humanas estabelecidas como Hfob 1.19, OCP1 e ROS17/2.8. (GARTLAND et al., 2005; MACDONALD, 1996; ROSA et al., 2002) ou células ósseas isoladas de locais não associados com a cavidade oral. (AÇIL et al., 2000; BELOTI; ROSA, 2005; GRUBER et al., 2002; JONSSON et al., 1999; MALEKZADEH et al., 1998; MIYAMOTO et al., 2004; SILVA et al., 2003; SPRINGER et al., 2004; VAN GRIENSVEN et al., 2002) podem não ser adequadas para estudos direcionados a aplicações dentais, tendo em vista as diferenças fenotípicas encontradas nessas diferentes populações de células ósseas humanas. As diferenças nas culturas de células ósseas da crista ilíaca e mandíbula podem refletir diferenças nas células ósseas presentes nos dois sítios *in vivo*. (KASPERK et al., 1995).

Malekzadeh et al. (1998) sugerem que biópsias intra-orais de tecido ósseo podem ser utilizadas como fonte de células autógenas, para que estas sejam amplificadas *in vitro* e, posteriormente, reimplantadas, com utilização de carreadores apropriados, para restauração de tecido ósseo perdido na cavidade oral. Contudo, a manipulação de material de biópsia humana incorre em alguns cuidados, que não são usuais quando se trata de tecido animal. Assim, é necessário obter-se consentimento do comitê de ética da instituição onde será realizada a manipulação, dos profissionais envolvidos na remoção dos tecidos e dos pacientes ou parentes. A cirurgia deverá ser realizada por um profissional da área cirúrgica em um momento que nem sempre é conveniente para o laboratório de cultura, sendo necessária a organização de um sistema de armazenamento. É necessário também que exista um sistema de recebimento dos espécimes e de registro dos detalhes. Deve-se ainda alertar o responsável pela realização da cultura, caso contrário, material valioso pode ser perdido ou deteriorado. Além do mais, o material de biópsia apresenta conteúdo de risco, sendo necessária sua manipulação em uma cabine de biossegurança Classe II. (FRESHNEY, 1999).

Para que as células cresçam *in vitro*, as condições da cultura devem mimetizar as condições *in vivo*, no que diz respeito à temperatura, ao oxigênio e a concentração de CO₂, pH, osmolaridade e nutrição. As principais funções do meio de cultura celular são de manter o pH e a osmolaridade para a viabilidade celular e de prover os nutrientes e energia necessários para o crescimento e multiplicação celular.

A escolha do meio não é sempre óbvia e freqüentemente permanece empírica, apesar de muitos anos de pesquisa exaustiva na combinação de meios com tipos celulares específicos e condições de cultura. A contaminação do meio com microorganismos e

substâncias químicas nocivas são os maiores riscos na preparação do meio. Por essa razão, cuidado particular deve ser tomado na seleção e preparação dos materiais. Alguns constituintes, são instáveis e devem ser adicionados imediatamente antes do uso. O meio basal de escolha deve ser capaz de suportar o crescimento de células apropriadas, através de pelo menos duas gerações de subculturas, sendo a suplementação com soro usualmente requerida para se atingir tal objetivo. Em função do seu rico conteúdo em fatores de crescimento e seu conteúdo baixo em gamaglobulina, o soro fetal bovino costuma ser adotado como suplemento padrão. O uso do soro impõe algumas dificuldades, tais como impacto na segurança, reprodutibilidade e custo. (CARTWRIGHT; SHAH, 1996).

Um grande número de diferentes meios foram desenvolvidos para suportar o crescimento de diferentes tipos de células. Alguns meios, como o meio de Eagle, foram projetados para culturas celulares de alta densidade, enquanto outros, como o Ham F12, são meios ricos, que foram originalmente desenvolvidos para o crescimento celular em baixa densidade. Em geral, muitas linhagens celulares aderentes podem crescer tanto em uma das modificações do meio basal de Eagle [DMEM ou meio de Eagle modificado por Glasgow (GMEM)] ou Ham F12 ou uma mistura de DMEM e F12. Em geral, a rotina do uso de antibióticos em cultura celular deveria ser evitada, desde que possível. A presença de antibióticos no meio pode mascarar uma infecção de baixo nível e encorajar técnica de assepsia pobre. Contudo, o tecido utilizado em cultura primária é freqüentemente não estéril e a adição de antibióticos e antimicóticos pode ser essencial para o estabelecimento da cultura. Sugere-se a adição de Penicilina (100IU/ml) e Estreptomicina (100µg/ml) para os primeiros dias; em algumas situações recomenda-se o uso de Fungizona (1µg/ml -2,5µg/ml) e Gentamicina (50µg/ml), podendo em algumas situações ser requerida concentração mais alta. (MACDONALD, 1996).

Quando se trabalha com células e objetiva-se culturas de curta duração, como é o caso da obtenção de metáfases do sangue periférico ou de medula, ou mesmo de embriões, os antibióticos podem ser utilizados visando evitar as eventuais contaminações pela manipulação externa ao fluxo laminar. Deve-se sempre levar em conta dois fatores: o grau de citotoxicidade do antibiótico e a resposta celular a este, uma vez que a interação entre ambas é muito variada. (cultilab, 2005).

Rosa et al. (2002) utilizaram o meio Ham F12 em experimento de cultura celular com células de linhagem osteoblástica estabelecida ROS17/2.8., suplementado com 8% de soro fetal bovino, 50nmg/ml de penicilina-estreptomicina, glutamina $5,4 \times 10^{-7}$ M e 0,3mg/ml de anfotericina B. O Ham F12, pelo seu teor de piruvato de sódio, é um meio muito

usado em reprodução, mas tem uma grande gama de aplicações por possuir uma série de nutrientes que facilitam o metabolismo celular, como a vitamina B₁₂, que é descrita como essencial para algumas células.

Meios mais complexos podem ser requeridos quando uma função especializada está sendo expressa ou quando células são subcultivadas em densidade baixa (10³/ml). Frequentemente, as condições de cultura com maior demanda, que precisam de meios complexos também requerem soro fetal bovino em vez de soro equino ou de novilho, a menos que a formulação especificamente permita a omissão do soro. Podem ocorrer surpresas, como aquelas em que mesmo com as melhores condições disponíveis para o estabelecimento da cultura, não haja concordância com o que a literatura apresenta. Nessas situações faz-se necessário a decisão por outra opção de formulação, conforme o comportamento das células. A reprodução das condições encontradas em outro laboratório pode ser difícil, em função das variações nas impurezas presentes nos reagentes e na água. (FRESHNEY, 1999).

A maior parte da informação genética de cada célula está acumulada no DNA do núcleo, sob uma forma codificada. Existe também uma pequena porção de informação genética fora do núcleo, nas mitocôndrias e nos cloroplastos. A informação genética armazenada no DNA pode ser duplicada (replicação) ou transcrita sob a forma de RNA, que se traduz como proteína. O DNA acumula as informações selecionadas durante a evolução, permitindo que as gerações sucessivas beneficiem-se dos aperfeiçoamentos introduzidos paulatinamente durante o processo evolutivo. Embora todas as células somáticas de um indivíduo possuam o mesmo genoma, ou seja, os mesmos genes, estes se encontram diferentemente expressos em cada tipo de célula. Tal fenômeno é que caracteriza os diferentes tipos celulares, pois as células de cada órgão expressam determinadas proteínas específicas daquele órgão ou mesmo dentro de um subtipo celular em um mesmo órgão, conferindo um fenótipo específico. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

De acordo com Freshney (1999) o fenótipo pode ser definido como o agregado de todas as propriedades expressas de uma célula, sendo um produto da interação do genótipo, com o meio ambiente regulatório. Assim, um neurônio é diferente de uma célula epitelial porque, embora o conjunto de genes seja o mesmo, eles se expressam de forma diferente. O nível de expressão também é fator importante na diferenciação do tipo de célula, ou seja, o quanto que uma célula produz de uma determinada proteína pode torná-la diferente de outra célula. Durante os processos fisiopatológicos ocorrem modificações na expressão de determinados genes, que podem estar muito ou pouco expressos, quando comparados com

uma situação de normalidade. O processo de síntese protéica, o qual é iniciado através de ativação gênica, é altamente sofisticado e submetido a um rigoroso controle, pois dele depende o funcionamento normal da célula, portanto, do organismo. Esse processo envolve inúmeros passos que podem ser suscetíveis a erros. Além disso, a maneira como uma célula, um órgão ou um indivíduo sintetiza suas proteínas depende de uma série de fatores, incluindo os genéticos e os ambientais. (SCHOR; BOIM; SANTOS, 2003).

Uma variedade de sondas de sítio único e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são muito úteis para a identificação de culturas celulares. (FRESHNEY, 1999). Ivanovski et al. (2001) utilizaram a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para comparar a expressão do RNAm das proteínas associadas ao tecido duro (fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea), das proteínas morfogenéticas (BMP-2 e BMP-4) dos fibroblastos gengivais com aquelas dos fibroblastos do ligamento periodontal; osteocalcina e sialoproteína óssea não puderam ser detectadas nos fibroblastos gengivais. Os autores sugeriram, então, que a osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea podem ser utilizadas como marcadores de células que têm o potencial para formação de tecido duro.

As evidências disponíveis indicam que as culturas de células derivadas do osso humano contêm células da linhagem osteogênica em todos os estágios de diferenciação e maturação. Isto foi confirmado pela expressão nestas culturas de proteínas presentes em ambos os estágios da diferenciação osteoblástica, tanto as precoces (fosfatase alcalina), quanto as tardias (osteocalcina e sialoproteína óssea). Outros marcadores para proteínas presentes em culturas de células osteoblásticas, como Osteonectina, têm sido utilizados na caracterização celular de osteoblastos. (DOGLIOLI; SCORTECCI, 1991; MAILHOT; BORKE, 1998; MALEKZADEH et al., 1998; NIEDEN; KEMPKA; AHR, 2003; YANG et al., 2001). As células normalmente apresentam morfologia típica, mas a forma varia entre doadores, podendo apresentar características semelhantes às dos fibroblastos em cultura. Alguns investigadores têm estudado os efeitos de repetidas subculturas na estabilidade fenotípica das células derivadas do osso humano, constatando que estas perdem suas características osteoblásticas-semelhantes. (GARTLAND et al., 2005; KASPERK et al., 1995).

Para que células cultivadas sejam utilizadas, em engenharia tecidual, com o intuito de formar tecido ósseo, é imprescindível que elas sejam capazes de formar matriz mineralizada *in vivo* (MALEKZADEH et al., 1998). Células osteoblásticas-semelhantes tratadas com glicocorticóides, na primeira passagem, mostraram um padrão de mineralização

localizado, com características de “manchas”, apesar de possuírem teores semelhantes de matriz extracelular e atividade da fosfatase alcalina daquelas tratadas desde a cultura primária com glicocorticóides e ascorbato. (GALLAGHER, 2003). A fosfatase alcalina é uma enzima importante no processo de biomineralização, promovendo a hidrólise do fosfato contido em substratos, produzindo ortofosfato e aumentando a deposição do fosfato de cálcio (AÇIL et al., 2000) e é expressa em altos níveis em osteoblastos. (PINERO et al., 1995). O nível de fosfatase alcalina no soro pode ser utilizado como um indicador sistêmico da formação óssea. (GARANT, 2003).

O ácido L-ascórbico (vitamina C) funciona como um co-fator na hidroxilação da lisina e da prolina em colágeno e é essencial para sua síntese e secreção. A adição de ácido L-ascórbico nas culturas derivadas de osso humano na cultura secundária aumenta a proliferação e a secreção do colágeno tipo I. Ocorre também um aumento na síntese de proteínas não-colagenosas, de forma mais importante a osteocalcina e a sialoproteína óssea, e deposição aumentada de matriz. (GARTLAND et al., 2005). Noventa por cento da matriz óssea consiste de colágeno tipo I, os 10% restantes possuem várias proteínas não colagenosas e pequenos proteoglicanos. (GARANT, 2003). A osteocalcina é a proteína não colagenosas mais abundante na matriz óssea mineralizada. (SEITZER et al., 1995). A osteopontina é um membro da família das proteínas que reside na matriz mineralizada e tem sido referida como uma citocina, com numerosas funções diretas sobre as células, afetando a imunidade, a metástase, a sensibilidade mecânica, a ação hormonal e a reabsorção óssea. (YOUNG, 2003).

Tanto os fibroblastos do ligamento periodontal, quanto os osteoblastos são capazes de sintetizar o colágeno tipo I, que constitui a matriz orgânica produzida pelos osteoblastos. (YOUNG et al., 1993). Como os dois tipos celulares têm origem mesenquimal, e são capazes de formar osso alveolar (MCKEE et al., 1993), eles podem ser identificados pela proteína do filamento intermediário denominada vimentina, que é uma parte do citoesqueleto. (MEAZZINI et al., 1998; SHAPIRO et al., 1995).

Osteosarcomas são tumores malignos do osso derivados de células da linhagem osteoblástica. Como as células de osteosarcomas expressam genes osteoblásticos, sintetizam proteínas da matriz óssea e, em muitos casos, respondem a hormônios reguladores de cálcio, incluindo hormônio paratiroideo, elas são extremamente úteis como um modelo de células osteoblásticas. Seu uso disseminado demonstra que os pesquisadores nem sempre levam em conta que algumas das características dessas células estão relacionadas com seu potencial oncogênico, não tendo relação com suas características osteoblásticas. Muitos

avanços significativos no nosso conhecimento da biologia óssea têm sido feitos através de experimentos com essas células. As linhagens celulares de osteoblastos humanos clonados mais comumente utilizadas são SaOs2, Mg63, Te85 (também referidas como HOS) e U2 OS (HTB96). Osteoblastos humanos clonados podem ser obtidos tanto da *American Type Culture Collection* (ATCC) ou da *European Collection of Cell Culture* (ECCAC). Uma vantagem das linhagens celulares de osteoblastos humanos transformados é que elas são facilmente manipuladas. Alternativas para as “clássicas” linhagens celulares derivadas de osteosarcomas são a linhagem celular hFOB 1.19 e, mais recentemente, a linhagem celular do osteoprecursor OCP1, sendo ambos derivados do tecido ósseo fetal humano. (GARTLAND et al., 2005).

Essas linhagens são de diferentes espécies animais, incluindo humanos e são apropriadas para várias utilizações, mas não são adequadas para todos os propósitos. Nessas situações, pode-se considerar o isolamento da própria cultura primária e, em alguns casos, até o estabelecimento de uma nova linhagem celular. Células primárias provêm a melhor aproximação da situação *in vivo*, e como consequência apresentam algumas desvantagens do tecido fresco. Eles são freqüentemente heterogêneos, os procedimentos variam de um dia para outro, e as preparações celulares não são sempre idênticas. O problema é exacerbado quando material humano é utilizado. Todas as culturas celulares primárias são caras e consomem muito tempo e as células freqüentemente têm uma sobrevivência muito curta. (MACDONALD, 1996).

Vários autores têm descrito experimentos com culturas celulares utilizando células osteoblásticas, com diferenças na origem, nos protocolos de obtenção e digestão, nos meios de cultura utilizados, nas suplementações, na utilização ou não de antibióticos, no número de passagens utilizadas e nas modalidades de caracterizações. A título ilustrativo, alguns trabalhos serão descritos a seguir.

Guerriero et al. (1995) realizaram cultura primária de osteoblastos humanos, a partir de osso mandibular. Explantes foram coletados e cultivados em quatro variações de meio de expansão (com baixa ou alta complementação de cálcio e com adição ou sem ascorbato de sódio). As células foram mantidas nos mesmos meios de expansão até a cultura secundária, quando foram transferidas para um meio de mineralização (DMEM suplementado com ascorbato e beta glicerofosfato, enriquecido com cálcio) e analisadas. Mistura de (1:1 v/v) do meio de mineralização DMEM com meio Ham F12 acelerou a síntese intracelular do colágeno tipo I e a calcificação da matriz extracelular. Os autores sugeriram que a presença ou ausência do cálcio e/ou do ascorbato no meio de expansão poderia modular significativamente a progressão das células ósseas oriundas da mandíbula humana de uma condição proliferativa

altamente indiferenciada para o fenótipo osteoblástico maduro.

Mailhot e Borke (1998) estabeleceram métodos *in vitro* de cultura e isolamento de células ósseas intra-orais humanas, derivadas dos sítios de preparações para instalação de implantes orais, em três indivíduos adultos. Fragmentos ósseos removidos das fresas das preparações dos sítios de implantes foram colocados imediatamente em DMEM e, posteriormente, sucessivos processos de digestão com collagenase foram realizados. As células derivadas do osso e remanescentes do tecido ósseo foram plaqueadas, com 20% de SFB/ DMEM, suplementado com ascorbato, em placas de cultura tratadas com fibronectina, para favorecer a aderência. Quando da confluência celular, as mesmas foram descoladas, através de tratamento com tripsina e transferidas para garrafas de cultura de 25cm², não tratadas com fibronectina, até que as células atingissem confluência, quando foram transferidas para garrafas não tratadas de 75cm². Utilizaram-se células da passagem 3 na referida pesquisa. As células foram caracterizadas como osteoblastos, através da determinação da atividade da fosfatase alcalina, da análise imunocitoquímica da osteocalcina, osteonectina e colágeno tipo I e da determinação da capacidade das células de produzirem calcificações, através da técnica de Von Kossa.

Malekzadeh et al (1998) isolaram células a partir de calvária humana fetal do segundo trimestre; os tecidos moles foram dissecados da calvária e o tecido mineralizado fragmentado em pequenos pedaços e seqüencialmente digerido. O meio de cultura utilizado foi DMEM, com 10% de SFB, suplementado com ascorbato. As células foram tripsinizadas, quando confluentes, através de combinação de tripsina (0,5g/l) e EDTA (0,2g/l). Células da passagem 3 e 4 foram utilizadas no estudo. A caracterização fenotípica foi realizada através da análise da atividade da fosfatase alcalina e comparada com células fibroblásticas gengivais (controle negativo) e linhagem celular de osteosarcoma MG-63(controle positivo). As células osteoblásticas-semelhantes isoladas apresentaram também característica morfológica poligonal alongada, típica de osteoblastos em cultura.

Jonsson et al. (1999) avaliaram e compararam três técnicas de isolamento para cultura primária de células osteoblásticas-semelhantes [(cultura de células do estroma da medula óssea (BMSC), cultura de explante de osteoblasto humano (hOB) e cultura de explante de osteoblasto, a partir de osso tratado com collagenase (hOB^{col})]. Após o estabelecimento das culturas das três modalidades analisadas, a partir de 16 espécimes ósseos, obtidos de 16 pacientes (osso trabecular da crista ilíaca e fêmur), o fenótipo osteoblástico nas culturas secundárias foi comparado, através de marcadores bioquímicos. Os autores concluíram que as culturas de células do estroma da medula óssea diferem significativamente

das culturas de explantes, obtidas do mesmo espécime ósseo e que as células que cresceram a partir dos explantes apresentam características fenotípicas similares, a despeito do tratamento com colágenase. Contudo, demonstrou-se que todas as culturas apresentaram células com capacidade de se diferenciar e induzir mineralização da matriz extracelular, em resposta à indução pelo ascorbato e pelo glicerofosfato.

Açil et al. (2000) isolaram células do osso trabecular de enxertos de crista ilíaca, para reparo de fissura palatina, de crianças com idades variando entre 8-10 anos. Fragmentos de 0,3cm-0,5cm de diâmetro foram cultivados, em forma de explantes, em 10%SFB/DMEM, suplementado com dexametasona (100nM) e ácido-áscorbico (1mM). Células foram definidas como osteoblasto-semelhantes através da análise da expressão de osteocalcina, utilizando anticorpos monoclonais, e da determinação de atividade da fosfatase alcalina, através de análise citoquímica.

Gruber et al. (2002) realizaram cultura primária de células ósseas humanas obtidas do osso ilíaco de pacientes, com idade variando entre 62 e 88 anos. Os fragmentos ósseos foram lavados com PBS e cultivados em garrafas de 75cm², com DMEM/HAM F12, suplementado com 10% de SFB, 100U/ml de penicilina G, 100µg/ml de estreptomicina e 0,25µg/ml de anfotericina B. As células que cresceram dos fragmentos ósseos (cultura de explantes) foram cultivadas por, pelo menos, duas semanas. As células da segunda e terceira passagens foram utilizadas nos experimentos. O protocolo de caracterização celular não foi descrito. Foi, posteriormente, verificado nesse estudo, que as plaquetas podem estimular a atividade mitogênica das células ósseas.

Van Griensven et al. (2002) propuseram uma metodologia simplificada de cultura primária de osteoblastos humanos, a partir de explantes, obtidos de vários tipos de espécimes de tecido ósseo. Foi utilizada cola de fibrina no fundo das placas de petri para otimizar a aderência dos explantes ósseos. Obteve-se confluência após 4-5 semanas do início das culturas. A caracterização celular foi realizada por coloração citológica (Von Kossa) e pela determinação da formação da fosfatase alcalina e do colágeno tipo I.

Uma cultura primária de osteoblastos humanos foi obtida (SILVA et al., 2003) da cabeça do fêmur de um paciente que se submeteu à cirurgia de recolocação total de quadril. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal de novilho, 1% de aminoácidos não essenciais, 150µg/ml de ácido L-ascórbico, 0,02M L-glutamina, 0,01M de Hepes, 100U/ml de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina. Foram analisadas as respostas das células osteoblásticas-semelhantes a quatro tipos diferentes de tratamento de superfícies de implantes dentais, e os autores concluíram que superfícies de

implantes de titânio, com rugosidades em suas superfícies oscilando entre 0,80µm e 1,90µm, podem otimizar algumas respostas celulares, tais como proliferação, atividade da fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização, mas não afetam a aderência celular ao titânio.

Ishino et al. (2003) coletaram tecido ósseo do seio etmoidal e realizaram cultura primária de osteoblastos humanos através de técnica de explantes. A caracterização celular foi realizada através da síntese do colágeno tipo I, atividade da fosfatase alcalina, da produção de matriz extracelular mineralizada, e da expressão da osteocalcina.

Rheuter et al. (2003) criaram um modelo para facilitar o estudo da morfogênese e proliferação das células do ligamento periodontal e osso alveolar, sob condições mais parecidas com as condições *in vivo*. Desenvolveu-se uma co-cultura primária organotípica dos dois tipos de células. Enquanto o tecido humano do ligamento periodontal foi obtido de pacientes juvenis (11-13 anos, dois pacientes masculinos e um feminino) o tecido do osso alveolar foi obtido através de osteotomia da região de segundos molares, de três pacientes do sexo masculino. De cada tecido, três culturas primárias foram estabelecidas, através de pequenos fragmentos dos tecidos (cultura de explantes). As culturas primárias foram estabelecidas e mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal de bezerro, 2mM L-glutamina e antibióticos (100U/ml de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina para cultura de explante do tecido ósseo; 50mg/ml de gentamicina para explante de cultura do tecido do ligamento periodontal). Depois de atingirem confluência de 80%, os fibroblastos do ligamento periodontal e os osteoblastos foram utilizados para o estabelecimento de mono e co-culturas). Foram utilizadas células de passagens 2 a 6. Os fibroblastos do ligamento periodontal foram caracterizados pela sua capacidade de expressar osteocalcina, pela atividade da fosfatase alcalina e pela síntese de matriz mineralizada.

Miyamoto et al. (2004) apresentaram relato de estudo experimental com cultura primária de células osteoblásticas-semelhantes obtidas do periósteo da tíbia de coelhos e posterior transplante dessas células, com utilização de carreador de colágeno, na calvária dos mesmos animais. Os autores concluíram que o volume de tecido mineralizado pode ser aumentado, através de procedimentos de regeneração óssea guiada, com utilização de células transplantadas no osso do crânio de coelhos *in vivo*.

Springer et al. (2004) realizaram um estudo avaliando a quantidade de células ósseas viáveis presentes em diferentes tipos de enxertos ósseos. Obtiveram-se amostras de pacientes com faixa etária entre 25-35 anos, oriundas da crista ilíaca, removidas com curetas, do osso esponjoso (particuladas ou não), fórceps, do osso cortical (particuladas

ou não) e coletor ósseo (com utilização de fresas esféricas diamantadas, fresas de implantes e escharificador esférico). Os fragmentos foram cultivados como explantes em garrafas de cultura de tecidos e após 4 semanas realizaram-se digestões com solução de tripsina-EDTA; posteriormente, foram realizadas contagem das células em câmara de Neubauer. As células foram classificadas como osteoblásticas-semelhantes através da determinação de marcadores osteoblástico-específicos na primeira passagem. Todos os grupos tiveram marcação positiva para os marcadores específicos utilizados. A partícula óssea reduziu a quantidade de osteoblastos viáveis. O tecido ósseo obtido dos coletores ósseos, após utilização de escharificador esférico resultou em menor número de células do que os outros métodos de coleta. Osso esponjoso não particulado apresentou a maior quantidade de osteoblastos viáveis. Ossos faciais não foram utilizados como fontes, nesse estudo, em função da disponibilidade limitada.

Beloti e Rosa (2005) obtiveram cultura primária humana de células do estroma da medula óssea, através da aspiração do osso medular do osso ilíaco de dois pacientes homens (24 e 33 anos) e analisaram o efeito do tratamento contínuo e descontínuo com dexametasona na diferenciação dessa cultura celular. Os autores concluíram que, para esse tipo de cultura, a presença contínua da dexametasona não é necessária para o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, mas que a sua presença após a primeira passagem é imprescindível para permitir a diferenciação osteoblástica e a formação de nódulos de mineralização.

A obtenção de novo osso para restaurar a função de ossos danificados, traumatizados ou perdidos é uma necessidade clínica e socioeconômica. A engenharia tecidual óssea anuncia-se como uma estratégia alternativa para a regeneração óssea, através da combinação de células maduras ou progenitoras com materiais e/ou matrizes biocompatíveis, com ou sem fatores de crescimento apropriados, para dar início ao reparo e à regeneração. (BROWN; PORTER, 2000).

O cultivo de células é normalmente realizado em placas ou garrafas contendo meios de cultura, que fornecem nutrientes para a viabilidade celular *in vitro*. Culturas celulares *in vitro* crescem em uma conformação bidimensional, carecendo da organização tridimensional que é típica dos tecidos naturais. Para a construção de um tecido em laboratório, é preciso fornecer uma estrutura semelhante a essa, na qual as células possam se apoiar para crescer na direção certa. Os moldes artificiais, as chamadas matrizes, podem ter várias origens, como os polihidroxialcanoatos, tais como o poliácido láctico, poliácido glicólico, poli-caprolactona (PEGO et al., 2003), hidrogéis à base de colágeno e/ou

polissacarídeos, tais como o alginato e a quitosana. (LEE et al., 2000; PIEPER et al., 1999). Matrizes empregadas na engenharia tecidual devem apresentar como característica essencial a integridade estrutural para que novos tecidos se desenvolvam. (LEE et al., 2000; STAMMEN et al., 2001). Vários polímeros sintéticos, com taxa de degradação controlável, adequados para utilização na área biomédica, têm sido desenvolvidos nos últimos anos. No final do processo regenerativo, o biomaterial deverá ser facilmente integrado no tecido neoformado, sem qualquer reação de corpo estranho e comportamento residual.

Neste momento, deve-se utilizar esta nova tecnologia apropriadamente, analisando-se com cautela como deve ser efetivada a sua transferência para a pesquisa clínica. A promessa da engenharia tecidual será efetivamente concretizada somente através da seleção de casos e técnicas cirúrgicas baseadas em evidências, acompanhadas de estudos dos resultados, que façam comparações com métodos atualmente disponíveis e referendados. (ASSAEL, 2003).

Esta pesquisa foi motivada pelas necessidades atuais da aplicação clínica dos princípios da engenharia tecidual na cavidade oral, com carência de trabalhos e protocolos de cultura primária de osteoblastos humanos, tendo como objetivo desenvolver um protocolo viável de coleta de tecido ósseo, utilizando o sistema de fresas de implantes dentais da Bycon™ (Boston, USA), estabelecimento de cultura primária e linhagem celular, e de caracterização de células humanas semelhantes a osteoblastos, oriundas da cavidade oral, otimizando procedimentos de biópsia óssea para coleta de material de enxerto autólogo, que estavam previstos para execução de outros procedimentos reconstrutivos.

1 ARTIGO

Revista: Clinical Oral Implants Research

TÍTULO: COLETA OTIMIZADA DE TECIDO ÓSSEO E CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS OSTEoblásticas-SEMELHANTES HUMANAS: UMA ESTRATÉGIA DE BIOENGENHARIA.

1.1 RESUMO

O êxito dos implantes osseointegrados depende do efeito e da correlação entre diversas variáveis, sendo imprescindível que o leito receptor ósseo apresente estrutura suficiente para recebê-los. Tecido ósseo autógeno oriundo da cavidade oral pode ser utilizado, quando é necessária a reconstrução da arquitetura óssea. Modelos de investigação científica, com cultura celular de osteoblastos, também têm sido amplamente utilizados em diferentes pesquisas aplicadas à implantodontia. A grande maioria destes estudos utiliza células oriundas de tecidos fetais ou neonatais de animais experimentais e células ósseas humanas isoladas de locais não associados com a cavidade oral; contudo estes modelos utilizam células que diferem daquelas da cavidade oral pelas diferenças morfológicas, fisiológicas e fenotípicas apresentadas. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um protocolo otimizado de coleta de tecido ósseo, utilizando fresas de implantes dentais do sistema Bycon™ (Boston, USA), estabelecimento de cultura primária, linhagem celular e caracterização das células osteoblásticas-semelhantes humanas oriundas da cavidade oral. Aspecto morfológico, produção de mineralizações (Von kossa), proliferação e caracterização fenotípica realizada através de Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) para Osteocalcina (OCN), Osteopontina (OPN), Fosfatase Alcalina (ALP) e Colágeno tipo I (Col I) foram analisadas, conforme protocolos estabelecidos para caracterização deste tipo celular. As células osteoblásticas-semelhantes expressaram OCN, OPN, ALP e COL I e formaram nódulos de mineralização. Os resultados encontrados nesta pesquisa, quando analisados em conjunto, demonstram que as células cultivadas apresentaram características morfológicas e fenotípicas de osteoblastos em cultura, podendo este modelo ser aplicado tanto em procedimentos regenerativos ósseos orais, quanto no estabelecimento da cultura primária e linhagem celular osteoblástica-semelhante.

Palavras-Chave: Cultura primária. Osteoblastos. Osteocalcina. Osteopontina. fosfatase alcalina. Colágeno tipo I.

1.2 ABSTRACT

The outcome of dental implants is dependent of the effect and the correlation between several variables, and when necessary, autogenous bone graft harvested from oral sites are the gold standard for GBR procedures. Scientific investigation

based on osteoblasts cultures are widely used in several studies applied to implantology. The majority of these studies utilize cells from fetal tissues or neonates experimental animals and human bone cells from oral cavity non associates sites. However, there are morphological, functional and phenotypic differences between species, adults and neonates and different regions in the same species. The objective of this study was to develop a optimized bone tissue harvesting viable protocol, osteoblast-like primary culture establishment and cellular line from oral cavity site. Morphological structure, mineralization production (Von Kossa), proliferation and phenotypic characterization by RT-PCR to OCN, OPN, ALP and COL I expression was analized. The osteoblast-like cells demonstrated OCN, OPN, ALP and ALP expression and ability to produce mineralization nodules. The results found in this study, when analyzed in conjunction, demonstrated that the cultured cells presented osteoblast in culture morphological and phenotypic characteristics. It was possible to utilize the harvesting autologous bone in the GBR procedures and in the osteoblast-like primary culture and line establishment.

Key words: Primary culture. Osteoblasts. Osteocalcin. Alkaline phosphatase. Osteopontin. Type I collagen.

1.3 INTRODUÇÃO

Os implantes osseointegrados têm sido amplamente utilizados na Odontologia, como elemento auxiliar nas reabilitações de áreas edêntulas, apresentando alto índice de previsibilidade. O êxito de tais implantes depende do efeito e da correlação entre as diversas variáveis que compõem uma equação que compreende a biocompatibilidade do material do implante, a natureza macroscópica e microscópica da sua superfície, o estado do seu leito, a técnica cirúrgica *per se*, cicatrização sem perturbações e o desenho da prótese instalada sobre o mesmo. (Albrektsson et al. 1981).

O leito receptor ósseo deve ter estrutura suficiente para receber o implante osseointegrado indicado para a situação, sendo necessária, em algumas situações, a reconstrução da arquitetura óssea, com utilização de biomateriais, enxertos autógenos e alógenos, embora existam restrições para todas estas técnicas.(Assael, 2003; Binderman & Fin, 1990; Damien & Parson, 1991; Hoppenreijts et al., 1992; Vacanti, 1998; Vacanti et al., 1999).

Diversas pesquisas têm utilizado técnicas de cultura de tecidos para investigar diversos aspectos: os papéis dos osteoblastos na bioquímica básica e fisiologia da formação óssea; as bases celulares e moleculares das doenças ósseas humanas; a participação dessas células na regulação da reabsorção óssea, assim como para testar e desenvolver agentes terapêuticos potenciais, novos biomateriais e aplicar a terapia celular e a engenharia tecidual para transplante ósseo. (Freshney, 1999; Gallagher, 2003; Gartland et al., 2005; Lee et al. 2000; c). Contudo a complexa estrutura do tecido ósseo, a heterogeneidade dos tipos celulares, bem como a interconexão da matriz extracelular e da fração mineral, tornam o osso um tecido difícil para extrair células e estudá-las em nível molecular e celular. (Gallagher et al., 1987b). Várias culturas de osteoblastos foram realizadas através de digestão enzimática de tecidos fetais (Bonewald et al., 2003; Yliheikkilä et al., 1995;) ou neonatais (Aybar et al. 2004; Chen et. al. 2002,) pouco mineralizados, com alta celularidade, a partir de animais experimentais, tendo sido evitado osso humano maduro e mineralizado. (Kasperk et al., 1995).

Têm-se também estudado os efeitos de repetidas subculturas na estabilidade fenotípica das células derivadas do osso humano e constatou-se que essas perdem suas características osteoblásticas-semelhantes (Gartland et al., 2005), fator que implica em controvérsias quando da extrapolação dos resultados obtidos em estudos realizados com células de passagens subsequentes à cultura secundária (Açil et al., 2000; Gruber et al. 2002; Jonsson et al., 1999; Mailhot & Borke, 1998; Malekzadeh et al., 1998; Mauney et al., 2004; Reuther et al, 2003).

A obtenção de novo osso para restaurar a função de ossos danificados, traumatizados ou perdidos é uma necessidade clínica, e de grande importância sócioeconômica. A engenharia tecidual óssea anuncia-se como uma estratégia alternativa para a regeneração óssea, através da combinação de células maduras ou progenitoras com materiais

e/ou matrizes biocompatíveis, com ou sem fatores de crescimento apropriados, para dar início ao reparo e à regeneração. (Brown & Porter, 2000).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo otimizado de coleta de tecido ósseo, através da utilização de fresas de implantes do sistema Bycon™ (Boston, USA), o estabelecimento de uma cultura primária e de uma linhagem celular, e a caracterização das células osteoblásticas-semelhantes humanas oriundas da cavidade oral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estabelecimento do protocolo proposto foram coletados materiais de 15 pacientes, tendo sido utilizadas diferentes áreas doadoras, modelos de obtenção, meios de cultura, suplementações e tipos de recipientes. As áreas doadoras utilizadas foram tuberosidade maxilar, sínfise mandibular, corpo e ramo da mandíbula, ilíaco e rebordo alveolar. Os modelos de obtenção utilizados foram trefinas ósseas, osteótomos, uso de articuladores ósseos, fresas cirúrgica e de implantes. Os meios de cultura utilizados foram Ham F12 e DMEM. Foram feitas suplementações com antibiótico e antifúngico complementar no meio de transporte e de cultura (PSA), glicocorticóides e ascorbato nas culturas primárias e secundárias. Foram utilizadas garrafas com e sem filtro, placas de vidro e placas de 6 e 24 poços(dados não mostrados).

2.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Obteve-se o material para o cultivo celular, através da biópsia de tecido ósseo córtico - esponjoso de região de sínfise da mandíbula, com a utilização de fresas ósseas de implantes, com motor elétrico em 50RPM, do sistema Bicon™ (Boston, USA), sob anestesia local, em condições de assepsia e anti-sepsia compatíveis ao ambiente ambulatorial (Fig. 01). Foram selecionados três pacientes, dois do sexo feminino, com 24 anos e 37 anos, e um do sexo masculino, com 37 anos; os dados das anamneses revelaram estado sistêmico normal e os pacientes não relataram uso de qualquer tipo de medicamento. Os pacientes tinham indicação de remoção cirúrgica de bloco córtico-esponjoso, para utilização como material de enxerto autólogo, em procedimento reconstrutivo ósseo intrabucal. Antes da realização da cirurgia, os pacientes foram informados sobre o projeto e optaram por participar deste por livre e espontânea vontade, com consentimento informado (protocolo de pesquisa nº

101/2004, aprovado em 26 de abril de 2004, pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina).

Após coleta dos explantes, esses foram lavados com soro fisiológico, à temperatura ambiente, por várias vezes, e colocados em garrafas de cultura celular de 25cm² (Fig. 02), com meio de cultivo Ham F12 (Cultilab, Campinas, Brasil) com antibiótico e antifúngico (Sulfato de Gentamicina (50mg/l) e anfotericina B (2mg/l)), suplementado com 12% de soro fetal bovino (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e transferidos para o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC.

2.2 CULTIVO PRIMÁRIO E ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM CELULAR

O protocolo básico adotado foi aquele estabelecido por Freshney (1999). Alterações neste protocolo foram efetuadas durante o desenvolvimento deste trabalho, de acordo com as necessidades, dificuldades e oportunidades.

A amostra coletada foi lavada com solução de Tyrode, As partículas ósseas separadas foram lavadas com meio Ham F12 com antibiótico e antifúngico(Sulfato de Gentamicina (50mg/l) e anfotericina B (2mg/l)), suplementado com 12% de soro fetal bovino (meio completo), e colocadas em uma garrafa de cultura celular (25cm²) estéril, e foram adicionados 4ml da solução de digestão (solução A: 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 0,05g NaH₂PO₄H₂O em 100ml de água destilada; solução B: solução de colágenase-tripsina - foram dissolvidas 137mg de Colágenase tipo I (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e 50mg de tripsina tipo III (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) em 10ml da solução A. O pH foi ajustado em 7,2 e completado para 100ml com água destilada. A água destilada foi esterilizada com filtro e distribuída em alíquotas de 10ml, sendo armazenadas à temperatura de -20°C). Esta solução foi adicionada às garrafas, cobrindo os espécimes ósseos. Agitou-se a solução, em agitador “Hot Rock” modelo RP-50 (Elmeco, USA), à temperatura ambiente, por

30min. Removeu-se a suspensão de células liberadas e estas foram descartadas, tendo em vista que tais células poderiam conter fibroblastos. Adicionou-se uma segunda alíquota de 4ml da solução de digestão aos fragmentos ósseos e esta foi agitada por 30min, à temperatura ambiente. Foi coletada a solução de digestão dos fragmentos ósseos e realizada centrifugação por 2min à 580Xg, à temperatura ambiente. Depois de removido o sobrenadante, as células foram adicionadas de 4ml do meio Ham F12, com antibiótico e antifúngico (Sulfato de Gentamicina (50mg/l) e anfotericina B (2mg/l)), suplementado com 20% de soro fetal bovino. Realizou-se centrifugação a 580Xg, por 10min e as células foram ressuspensas em 4ml do meio completo e colocadas em garrafas de 25cm². No ínterim, foram adicionadas 4ml da solução de digestão aos fragmentos de osso remanescentes e repetiu-se a digestão por 30min; as células liberadas foram coletadas.

As garrafas foram posteriormente deixadas na posição horizontal, em estufa, 5% CO₂ (NuairTM US Autoflow CO₂ Water Jacketed Incubator, EUA), 37°C, por 5 a 7 dias; durante esse período, foi checado o crescimento celular, utilizando-se microscópio de fase invertida (40x a 200x, Olympus, Japão). Conforme necessário, o meio das garrafas foi substituído por meio completo fresco (em torno de duas vezes por semana). A mudança do meio de cultivo foi realizada a partir da observação de alteração da coloração, indicando atividade metabólica celular, alteração de pH e conseqüente necessidade de troca do meio.

Quando se atingiu a subconfluência de aproximadamente 80%, o tapete celular foi tripsinizado, com tripsina a 0,25% (tripsina: EDTA 1: 250), para obter individualização celular, e essa cultura primária foi subcultivada, na razão 1:1, em passagens subseqüentes. Neste momento, foi estabelecida a linhagem celular, a partir da cultura primária dos três pacientes selecionados.

2.3 ACOMPANHAMENTO DA PROLIFERAÇÃO E DO ASPECTO MORFOLÓGICO CELULAR

As células cultivadas foram observadas, monitoradas e fotografadas (100X e 400X) em microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK 40) a cada três dias, com posterior troca de meio. As imagens foram analisadas, para acompanhamento das características morfológicas das células, até que estas atingissem estágio de subconfluência, quando foram feitas as tripsinizações e as respectivas passagens. As cultura primária e secundária foram fotografadas para posterior comparação com os dados da literatura.

2.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA LINHAGEM ESTABELECIDADA

Os experimentos foram realizados nas linhagens estabelecidas, em primeira passagem (P1), para a detecção da expressão de determinadas proteínas, através da reação de RT-PCR. A reação de PCR foi precedida de uma etapa de transcrição reversa para síntese do DNA complementar. Os sinais foram comparados com um controle positivo (tecido ósseo humano) e um controle negativo (fibroblastos de gengiva humana).

2.4.1 Extração de RNAs totais

As células foram cultivadas até atingirem subconfluência. Após esse período, o meio de cultura foi removido e os RNAs totais foram extraídos utilizando-se o reagente TRIzol™ (Invitrogen, USA), de acordo com as orientações do fabricante. A concentração dos RNAs foi estimada por espectrofotometria no UV a 260nm.

2.4.2 Síntese do cDNA – transcrição reversa

A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir de 1,0 µg do RNA total, obtido pela extração com o TRIzol™, utilizando-se um *kit* para transcrição reversa ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen, USA), conforme especificações do fabricante.

2.4.3 Reação do RT-PCR

Para a RT-PCR o cDNA foi diluído 1:5, sendo então utilizado 2µl do cDNA diluído, em uma reação de 25µl, utilizando-se 1 unidade de enzima DNA polimerase. A amplificação ocorreu em 30 ciclos (desnaturação a 94°C por 1min; anelamento a 58°C por 1min e extensão a 72°C por 1,5min) com uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 2min e uma etapa final de extensão 72°C por 7min. O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose a 2% (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) corado com brometo de etídeo (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) e fotografado em sistema digital de análise de imagem (EDAS290 Kodak). Como controle negativo foram utilizados fibroblastos humanos, obtidos de cultura primária de tecido gengival. (Coura et al., 2006).

Os *primers* utilizados foram obtidos de seqüências de mRNA humanos de ALP, OPN, OCN, COL I e Vimentina (VIM), disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (2007). As seqüências escolhidas (Quadro 01) foram testadas através do programa de análise de *primers* Oligo-6™ e adquiridas da Invitrogen (Invitrogen, USA). Foram feitas duas repetições em cada linhagem estabelecida.

2.5 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO

Os Osteoblastos foram cultivados, em primeira passagem, em placas de cultura de 24 cavidades, em densidade de 2×10^4 células/cavidade, em meio completo de

cultura. As mesmas foram mantidas por um dia, somente em meio, para aderência das mesmas (designado dia 0), quando as mesmas passaram a ser cultivadas em meio de mineralização (meio completo, 100µg/ml de ácido ascórbico (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) e 10mM de β -glycerofosfato (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA)). Trocou-se o meio de mineralização nos dias 2, 5, 8 e 10, e a revelação dos nódulos de mineralização foi feita no dia 12, através da técnica de coloração de Von Kossa para avaliação de fosfato, conforme protocolo descrito por Bonewald et al. (2003). Os nódulos de mineralização foram observados através de microscopia de luz e de contraste de fase (microscópio Olympus modelo CK 40), em campo claro. As imagens foram obtidas através de máquina digital Olympus modelo C-5060, em aumentos de 100X e 400X. Foram feitas três repetições em cada linhagem estabelecida.

3 RESULTADOS

3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

O material autógeno obtido tanto pôde ser utilizado nos procedimentos regenerativos previstos (Fig. 03 e 04), quanto no estabelecimento da cultura primária e linhagem celular osteoblástica-semelhante. Não houve necessidade dos fragmentos serem particulados após sua remoção das fresas de implantes utilizadas.

3.1.1 Obtenção da Cultura Primária, Acompanhamento da Proliferação e do Aspecto Morfológico Celular e Estabelecimento de Linhagem Celular

As células foram isoladas a partir das digestões enzimáticas sequenciais, conforme descrito, tendo sido utilizadas as células da segunda e terceira digestão. Pôde-se observar que as células, quando do seu isolamento, eram muito pequenas, apresentavam morfologia arredondada, trazendo dificuldades na sua identificação e contagem (Fig. 05). A morfologia típica dos osteoblastos em cultura (células poligonais, alongadas) foi observada entre os dias 10 e 15 (Fig. 06); a partir desse momento, ocorreu proliferação acentuada, até as células atingirem estágio de subconfluência aproximado de 80%, entre os dias 25-40 (Fig. 07), quando foi realizada tripsinização do tapete celular com tripsina a 0,25% (tripsina: EDTA 1: 250), caracterizando a primeira passagem e conseqüente estabelecimento da linhagem celular. Nesse momento, estabeleceram-se as linhagens denominadas NNGZ-1, NNGZ-2 e NNGZ-3, a partir da cultura primária dos três pacientes selecionados.

Nas culturas secundárias, as células já apresentavam morfologia característica no dia 3, com grande proliferação celular, formando agrupamentos celulares de difícil individualização, a partir do dia 5. No dia 12, as células organizavam-se em

grupamentos com grande densidade celular, mas se podia observar espaçamentos entre os grupos de células.

3.1.2 Avaliação Fenotípica das Células Cultivadas

A Fig. 08 mostra a marcação das bandas correspondentes à expressão das proteínas OPN, OCN, ALP e COL I, indicando a presença das mesmas, tanto nas células osteoblásticas-semelhante cultivadas (bandas 1-4) quanto no tecido ósseo humano (controle positivo; bandas 5-8). A Fig. 09 mostra que nos fibroblastos de gengiva humana (Coura et al. 2006) não houve expressão das proteínas OPN, OCN, ALP e COL I, mas somente da proteína VIM (Meazzini et al. 1998, Shapiro et al. 1995).

3.1.3 Ensaio de Mineralização

Foi demonstrado que as células formaram áreas de calcificação de graus variados, característica de células osteoblásticas em cultura (Fig. 10 e 11), também chamados nódulos de calcificação, evidenciados através da coloração de Von Kossa.

4 DISCUSSÃO

O modelo de cultura celular tem sido muito utilizado para investigação da biologia óssea (Gartland et al, 2005), mas como o osso é um tecido difícil de se extrair células para estudá-las em nível molecular e celular (Gallagher et al., 1987a), tem-se utilizado o osso altamente celular e pouco mineralizado de modelos animais, com a utilização de calvária de animais fetais (Bonewald et al., 2003; Yliheikkilä et al., 1995) e neonatais (Aybar et al., 2004; Chen et al., 2002). Quando da utilização de células ósseas humanas nos estudos da cavidade oral *in vitro*, tem-se optado pela utilização de linhagens celulares ósseas humanas isoladas de locais não associados com a cavidade oral (Açil et al. 2000; Beloti & Rosa, 2005; Gruber et al., 2002; Jonsson et al. 1999; Malekzadeh et al., 1998; Miyamoto et al., 2004; Silva et al. 2003; Springer et al., 2004; Van Griensven et al., 2002), clonadas de osteossarcomas (Gartland et al. 2005) ou culturas primárias obtidas de outras regiões (Açil et al. 2000; Chen et al. 2002; Gruber et al. 2002; Mauney et al. 2004). Algumas limitações na utilização desses modelos, tais como diferenças fenotípicas, origem, subtipos celulares e características fisiopatológicas, geram restrições na transposição dos resultados para a atividade celular *in vivo* (KASPERK et al., 1995), tornando-se imperativo o desenvolvimento e o aprimoramento de culturas primárias com tecido obtido da própria cavidade oral.

O protocolo de cultura primária utilizado neste trabalho, inicialmente proposto por Freshney (1999), com as alterações realizadas e descritas, não foi relatado por outros pesquisadores no Brasil, sendo possivelmente o primeiro protocolo de obtenção de cultura primária e estabelecimento de linhagem celular de células oriundas da cavidade oral estabelecido no país. Através deste, possibilitou-se a utilização de fragmentos ósseos, tanto na cultura primária e amplificação celular, quanto nos procedimentos reconstrutivos que estavam previstos para os pacientes. O material autógeno utilizado, provavelmente, apresentou maior volume e número de células viáveis do que aquelas possíveis de serem obtidas através de

coletores ósseos e preparadas para uso por meio de particuladores, comumente utilizados em procedimentos reconstrutivos ósseos orais. (Springer et al. 2004). Esse dado terá que de ser confirmado em experimentos posteriores, através de testes específicos.

A utilização de tecido ósseo oral como fonte de culturas primárias, nesta modalidade de estudos, tem sido citada por alguns autores (Guerriero et al. 1995; Mailhot & Borke, 1998; Rheuter et al. 2003) havendo, contudo, uma limitação de tecido disponível para obtenção de células dessa área (Springer et al. 2004). Fragmentos ósseos obtidos de fresas de implantes foram utilizados anteriormente como fonte de obtenção de células para cultura primária (Mailhot & Borke, 1998), contudo tais fresas foram utilizadas no preparo dos nichos de implantes, não tendo sido citadas as características da coleta. Normalmente os preparos de nichos de implantes são realizados com rotações aproximadas de 1800 rotações por minuto (rpm), com irrigação abundante, não favorecendo a coleta de tecido ósseo. As fresas de implantes dentais utilizadas neste trabalho mostraram-se eficientes na coleta e aproveitamento dos fragmentos de tecido ósseo, pelas suas características físicas, pelo fato de terem sido utilizadas em baixa rotação (50rpm), além da possibilidade de utilização destas sem irrigação, durante as intervenções cirúrgicas, o que levou a um aumento considerável na proporção material disponível/material aproveitado.

As células osteoblásticas-semelhantes em cultura normalmente apresentam morfologia típica, mas a forma varia entre doadores, de fibroblástico-semelhante à poligonal alongada (Aybar et al. 2004; Gallagher 2003; Malekzadeh et al. 1998). Tal morfologia começou a ficar evidente entre os dias 10 e 15 do plaqueamento. O estágio de subconfluência foi atingido entre os dias 25 e 40, em conformidade com dados da literatura (Gartland et al. 2005), tendo sido observado que a idade do doador influenciou nestes resultados, demorando mais para ficar evidente a morfologia típica e o estágio de subconfluência nos dois pacientes com maior idade. Esses dados precisam ser melhor analisados em futuras investigações, tendo

em vista que outras variáveis estão presentes e podem influenciar estes resultados. Parei aqui!!!

As células foram caracterizadas fenotipicamente na primeira passagem (P1), tendo em vista que existem evidências da perda da estabilidade fenotípica das células derivadas do osso humano após repetidas subculturas (Gartland et al. 2005). Têm-se utilizado P1 em diversos experimentos com osteoblastos em cultura (Aybar et al. 2004; Chen et al. 2002; Guerriero et al. 1995; Jonsson et al. 1999; Springer et al. 2004; Yliheikkilä et al. 1995), mas outros autores relatam utilização de células de passagens subsequentes (Açil et al. 2000; Gruber et al. 2002; Mailhot & Borke 1998; Malekzadeh et al. 1998; Mauney et al. 2004; Rheuter et al. 2003). Em termos práticos, a perda de estabilidade fenotípica apresenta dificuldades reais, tendo em vista que é desejável a obtenção de um grande número de células a partir de um mesmo doador, fato que se torna possível nos protocolos de digestão enzimática do tecido ósseo somente depois de repetidas subculturas.

As evidências disponíveis indicam que as culturas de células derivadas de osso humano contêm células da linhagem osteogênica, em estágios de diferenciação e maturação. Foram utilizados nesta pesquisa marcadores moleculares para algumas proteínas associadas com tecido ósseo e que vêm sendo descritas como apropriadas para caracterização osteoblástica. Por meio dos resultados positivos, obtidos através das reações de RT-PCR para OPN, OCN, ALP e COL I, pôde ser confirmada, nas culturas estabelecidas, a expressão das proteínas presentes nos estágios de diferenciação e maturação osteoblástica. Outros autores também utilizaram marcadores para OPN (Ivanovski et al. 2001), OCN (Açil et al. 2000; Doglioli & Scortecchi 1991; Ivanovski et al. 2001; Ma et al. 2001; Mailhot & Borke 1998; Nieden et al. 2003; Reuther et al. 2003; Yamada et al. 2003; Yang et al. 2001), ALP (Ivanovski et al. 2001; Pinero et al. 1995; Mailhot & Borke 1998) e COL I (Ishino et al. 2003; Mailhot & Borke 1998; Yang et al. 2001; Van Griensven et al. 2002,) para caracterização

osteoblástica, e os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes aos destes inúmeros autores.

O êxito de se cultivar qualquer tipo de células somente pode ser atingido se houver um marcador específico do fenótipo, que possa ser utilizado para confirmar a identidade das células *in vitro* e, no caso das culturas osteoblásticas, a osteocalcina indubitavelmente permanece como o marcador mais específico do fenótipo osteoblástico (Ivanovski et al. 2001; Gallagher 2003; Gartland et al. 2005), tendo ficado evidente a expressão desta proteína nas células cultivadas. As marcações positivas encontradas nas reações de RT-PCR foram muito semelhantes àquelas do tecido ósseo (controle positivo), sendo mais uma prova da característica fenotípica osteoblástica das células das culturas estabelecidas (Fig. 08).

Como contraprova foi realizada reação de RT-PCR para os mesmos marcadores, acrescentando-se, ainda a VIM (proteína do filamento intermediário do citoesqueleto dos tipos celulares que têm origem mesenquimal) para o controle negativo (fibroblastos gengivais humanos). Como somente ocorreu a expressão da VIM nas células utilizadas como controle negativo (Meazzini et al. 1998; Shapiro et al. 1995), descartou-se qualquer hipótese de se caracterizar as células das culturas estabelecidas como fibroblásticas-semelhantes (Fig. 09). Esse resultado difere parcialmente daquele relatado na literatura (Ivanovski et al. 2001), no qual a ALP foi expressa por fibroblastos gengivais. Tal divergência, talvez, possa ser explicada pelo fato de que as células gengivais utilizadas no controle negativo estavam em passagem 7 (P7), podendo ter havido perda da estabilidade fenotípica dessa linhagem.

A coloração de Von Kossa tem sido utilizada para verificar a capacidade das células de produzir nódulos de mineralização (Cheng et al. 1994; Ivanovski et al. 2001; Mailhot & Borke 1998; Nieden et al. 2003; Yang et al. 2001) e os resultados destes trabalhos

corroboram com os obtidos nesta pesquisa, em que as células osteoblásticas-semelhantes obtidas nas culturas também formaram nódulos de mineralização *in vitro*. A formação de nódulos mineralizados *in vitro* (Fig. 10) foi uma evidência de que a diferenciação dos osteoblastos ativos pode ocorrer nas culturas de células osteoblásticas-semelhantes humanas obtidas da cavidade oral, na presença de β -Glicerofosfato e Ascorbato, através do protocolo proposto. Contudo, para que células cultivadas sejam utilizadas em engenharia tecidual, com o intuito de formar tecido ósseo, é imperativo que elas sejam capazes de formar matriz mineralizada *in vivo* (Malekzadeh et al. 1998). Futuras investigações serão necessárias para demonstrar que essas células cultivadas formam osso semelhante àquele formado *in vivo* e possam, conseqüentemente, ser utilizadas clinicamente em estratégias de engenharia tecidual.

Células osteoblásticas-semelhantes tratadas com glicocorticóides, na primeira passagem (Guerriero et al. 1995; Beloti & Rosa 2005), mostram um padrão de mineralização localizado, com características de “manchas”, como o padrão de mineralização encontrado neste trabalho (Fig. 11), sendo relatado na literatura que estas apresentam quantidades semelhantes de matriz extracelular e atividade da fosfatase alcalina daquelas tratadas desde a cultura primária com glicocorticóides (Açil et al. 2000) e ascorbato (Açil et al. 2000; Gallagher 2003; Mailhot & Borke 1998; Malekzadeh et al. 1998; Silva et al. 2003). A adição de ácido L-ascórbico nas culturas derivadas de osso humano na cultura secundária (Guerriero et al. 1995) aumenta a proliferação e a secreção do colágeno tipo I. Ocorre também um aumento da síntese de proteínas não-colagenosas (especialmente a osteocalcina e a sialoproteína óssea) e uma deposição aumentada de matriz (Gartland et al. 2005).

Alguns pesquisadores sugerem a utilização do ascorbato desde a cultura primária (Açil et al. 2000; Gallagher 2003; Mailhot & Borke 1998; Malekzadeh et al. 1998; Silva et al. 2003) para que suas propriedades sejam melhor aproveitadas. Tem-se sugerido que a presença ou ausência do cálcio e/ou ascorbato no meio de expansão pode significativamente

modular a progressão das células ósseas oriundas da mandíbula humana de uma condição proliferativa altamente indiferenciada para o fenótipo osteoblástico maduro (Guerriero et al. 1995). Quando da tentativa de utilização desses suplementos na cultura primária, na padronização do protocolo desta pesquisa, observou-se perda da capacidade proliferativa das células e aumento de morte celular (dados não mostrados), não tendo sido conseqüentemente utilizados tais suplementos no protocolo das culturas primárias descritas; contudo, a ausência destes suplementos não se mostrou fator limitante para a verificação da expressão das proteínas analisadas. Outros autores também observaram expressão da ALP (Ivanovski et al. 2001; Aybar et al. 2004), OCN (Ivanovski et al. 2001; Aybar et al. 2004) e da OPN (Ivanovski et al. 2001), através de RT-PCR (Ivanovski et al. 2001), sem suplementar o meio de cultura com ascorbato e glicocorticóides.

Os resultados encontrados nesta pesquisa, quando analisados em conjunto, demonstram que as células cultivadas apresentaram características morfológicas e fenotípicas de osteoblastos em cultura. Este modelo otimizado de obtenção de tecido ósseo da cavidade oral proporciona condições favoráveis para o isolamento e cultivo de células, que podem ser utilizado no desenvolvimento de novos biomateriais, na confirmação e desenvolvimento de protocolos de terapia celular aplicados à implantodontia, e na regeneração óssea guiada. Este protocolo também pode ser utilizado, como estratégia de bioengenharia óssea, nos procedimentos regenerativos, quando houver necessidade de reconstrução da estrutura óssea para colocação de implantes dentais. Embora grandes avanços no conhecimento da biologia óssea tenham sido alcançados até o momento, futuros passos necessitam ser tomados para que haja um melhor entendimento do que é necessário para se desenvolver um osso obtido através da engenharia tecidual, com possibilidade de aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

- Açil, Y., Terheyden, H., Dunsche, A., Fleiner, B. & Jepsen, S. (2000) Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *Journal of Biomedical Materials Research* 4:703-710.
- Albrektsson, T., Branemark, P. I., Hansson, H. A. & Lindstron J. (1981) Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 52:155-170.
- Assael, L. A. (2003) The promise of tissue engineering. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 61(2):155-156.
- Aybar, B., Bilir, A., Akçakaya, H. & Ceyhan, T. (2004) Effects of tricalcium phosphate bone graft material on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clinical Oral Implants Research* 15:119-125.
- Beloti, M. M. & Rosa, A. L. (2005) Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Brazilian Dental Journal* 16(2):156-161.
- Binderman, I. & Fin, N. (1990) Bone substitutes organic, inorganic, and polymeric: cell material interactions. In: Yamamuro, T., Hench, L. & Wilson J, (Ed.). *CRC Handbook of Bioactive Ceramics*. p.45-51. Boca Raton: CRC Press.
- Bonewald, L. F., Harris, S. E., Rosser, J., Dallas, M. R., Dallas, S. L., Camacho, N. P., Boyan, B. & Boskey, A. (2003) Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization *in vitro* represents bone formation. *Calcif Tissue Int* 72:537-547.
- Brown, R. A. & Porter, R. A. (2000) Tissue engineering. In: Masters, J.R.W. *Animal Cell Culture*. 3rd. edition, cap. 6. Oxford: Oxford University press.
- Chen, F., Mao, T., Tao, K., Chen, S., Ding, G. & Gu, X. (2002) Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 60:1155-1159.
- Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F. & Avioli, L. V. (1994) Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134: 277-286.
- Coura, G. S., Zortéa Junior, A. J., Savi, L. A., Simões, C. M. O. & Magini R. S. (2005) Protocolo preliminar de cultura de fibroblastos gengivais humanos. *Revista Brasileira de Implantodontia & Prótese sobre Implantes* 12(47/48):190-196.
- Coura, G. S.; Zortéa Júnior, A. J.; Savi, L. A.; Magini, R. S. & Simões, C. M. O. (2006) Protocol of human gingival fibroblast culture. evaluation of cell viability and potential DNA cellular damage. *Brazilian Dental Journal*, Ribeirão Preto. No prelo.
- Damien, J. C. & Parson, J. R. (1991) Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *Journal Applied Biomaterials* 2:187-208.

Doglioli, P. & Scortecchi, G. (1991) Characterization of endosteal osteoblasts isolated from human maxilla and mandible: an experimental system for biocompatibility tests. *Cytotechnology* 7(1): 39-48.

Freshney, R. I. (1999) Culture of Animal Cells. *A Multimedia Guide*. New York: Wiley-Liss, Cd-Rom

Gallagher, J. A. (2003) Human osteoblast culture. In: Helfrich, M. H. & Ralston, S. H., Ed. *Bone Research Protocols*, NJ.29- 51. Humana: Totowa.

Gallagher, J. A., Beresford, J. N., Caswell, A., Russell, R. G. G., Kasperk, C., Wergedal, J., Strong, D., Farley, J., Wangerin, K., Gropp, H. & Ziegler, R. (1987a) Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:2511-2517.

Gallagher, J. A., Beresford, J. N., Caswell, A. & Russell, R. G. G. (1987b) Subcellular investigations of skeletal tissue. In: Peters, T. J., ed. *Subcellular Pathology of systemic disease*, p.377–397. London: Chapman and Hall.

Gartland, A., Buckley, K. A., Dillon, J. P., Curran, J. M., Hunt, J. A. & Gallagher, J. A. (2005) Isolation and culture of human osteoblasts. . In: PICOT, Joanna (Ed.). *Human cell culture protocols*. 2nd edition, p.29-54. Totowa, NJ: Humana. (Methods in molecular medicine, v.107)

Gruber, R., Varga, F., Fischer, M. B. & Watzek, G. (2002) Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clinical Oral Implants Research.*, 13:529-535.

Guerriero, C., De Santis, D., Nocini, P. F., Gotte, P. & Armato, U. T. (1995) Tissue culture of adult human osteoblasts isolated from jaw bones. *Italian Journal of Anatomy Embryology*. 100(1):83-93. Suppl.

Hoppenreijts, T. J., Nijdam, E. S. & Freihofer, H. P. (1992) The chin as a donor site in early secondary osteoplasty: a retrospective clinical and radiological evaluation. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery* 20: 119–124.

Ishino, T., Yajin, K., Takeno, S., Furukido, K. & Hirakawa, K. (2003) Establishment of osteoblast culture from human ethmoidal sinus. *Auris, Nasus, Larynx*. 30(1):45-51.

Ivanovski, S., Li, H., Haase, H. R. & Bartold, P. M. (2001) Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 36:131-131.

Jonsson, K. B., Frost, A., Nilsson, O., Ljunghall, S. & Ljunggren, O. (1999) Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 70(4):365-373.

Kasperk, C., Wergedal, J., Strong, D., Farley, J., Wangerin, K., Gropp, H., Ziegler, R. & Baylink, D. J. (1995) Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Chevy Chase*, 80:2511-2517.

- Keller, J. C., Collins, J. G., Gabrielle, G. N. & McGee, T. D. (1997) In vitro attachment of osteoblast-like cells to osteoceramic materials. *Dental Materials, Kidlington*, 13:62-68.
- Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir K. H. & Mooney, D. J. (2000) Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules* 33:4291-4294.
- Ma, P. X., Zhang, R., Xiao, G. & Franceschi, R. (2001) Engineering new bone tissue *in vitro* on highly porous poly (Hydroxyl acids) / hydroxylapatite composite scaffolds. *Journal of Biomedical Material Research* 54:284-293.
- Mailhot, J. M. & Borke, J. L. (1998) An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. *Clinical Oral Implants Research, Copenhagen*, 9(1):43-50.
- Malekzadeh, R., Hollinger, J. O., Buck, D., Adams, D. F. & McAllister, B. S. (1998) Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *Journal of Periodontology* 69:1256-1262.
- Mauney, J. R., Blumberg, J., Pirun, M., Volloch, V., Vunjak-Novakovic, G. & Kaplan, D. L. (2004) Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds *in vitro*. *Tissue Engineering*, 10(1/2): 81-92.
- Meazzini, M. C., Toma, C. D., Schaffer, J. L., Gray, M. L. & Gerstenfeld, L. C. (1998) Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain *in vitro*. *Journal of Orthopaedic Research, Hoboken*, n.16, p.170–180.
- Miyamoto, I., Tsuboi, Y., Takahashi, K., Hyon, S. H. & Iizuka, T. (2004) Enhancement of bone volume in guided bone augmentation by cell transplants derived from periosteum: an experimental study in rabbit calvarium bone. *Clinical Oral Implants Research, Copenhagen*, n.15, p.308-314.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 20 jun. 2007.
- Nieden, N. I. Z., Kempka, G. & Ahr, H. J. (2003) *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 71:18-27.
- Pego, A. P., Poot, A., Grijma, D. & Feijen, J. (2003) Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. *Journal of Controlled Release* 87:69-79.
- Pieper, J. S., Oosterhof, A., Dijkstra, P. J., Veerkamp, J. H. & Kuppevelt, T. H. (1999) Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* 20:847-848.
- Pinero, G. J., Farach-Carson, M. C., Devoll, R. E., Aubin, J. E., Brunn, J. C. & Butler, W. T. (1995) Bone matrix proteins in osteogenesis and remodeling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Archives of Oral Biology, Oxford*, n.40, p.145-155, 1995.

Reuther, T., Kohl, A., Komposch, G. & Tomakidi, P. (2003) Morphogenesis and proliferation in mono- and organotypic co-cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and alveolar bone cells. *Cell and Tissue Research*, 312:189–196.

Schmalz, G. (2002) Materials science: biological aspects. *Journal of Dental Research* 81(10):660-663

Schuster, U., Schmalz, G., Thonemann, B., Mendel, N. & Metzl, C. (2001) Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *Journal of Endodontics*, 27:259–265.

Shapiro, F., Cahill, C., Malatantis, G. & Nayak, R. C. (1995) Transmission electron microscopic demonstration of vimentin in rat osteoblast and osteocyte cell bodies and processes using the immunogold technique. *Anatomical Record*, 241:39–48.

Silva, M. H. P., Soares, G. D. A., Elias, C. N., Best, S. M., Gibson, I. R., Disilvio, L. & Dalby, M. J. (2003) In vitro cellular response to titanium eletrochemically coated with hidroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness. *Journal of Materials Sciences*, 14:511-519.

Springer, I. N. G, Terheyden, H., Geib, S., Harle, F., Hedderich, J. & Açil, Y. (2004) Particulated bone grafts-effectiveness of bone cell supply. *Clinical Oral Implants Research* 15(2):205-215.

Stammen, J. A, Willians, S., Ku, D. & Gulberg, R. E. (2001) Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterial* 22:799-806.

Thonemann, B. & Schmalz, G. (2000) Immortalization of bovine dental papilla cells with simian virus 40 large T antigen. *Archives of Oral Biolology, Oxford*, 45:857–869.

Ueda, M., Tohnai, I., Nakai, H. (2001) Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artificial. Organs*. 25(3):164-171.

Vacanti, J. P: (1998) Beyond transplantation. *Archives of Surgery, Chicago*, 123:545–549.

Vacanti, M. D., Charles A. & Bonassar, L. J. (1999) An overview of tissue engineered bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*,. 367S:375-381.

Van Griensven, M., Zeichen, J., Tschernig, T., Seekamp, A. & Pape, H. C. (2002) A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue specimens using fibrin glue. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 54(1):25-29.

Yamada, Y., Boo, J. S., Ozawa, R., Nagasaka, T., Okazaki, Y., Hata, K. I. & Ueda, M. (2003) Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 31(1):27-33.

Yang, X. B., Roach, H. I., Clarke, N. M. P., Howdle, S. M., Quirk, R., Shakesheff, K. M. & Oreffo, R. O. C. (2001) Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone* 29:523-531.

Yliheikkilä, P. K., Felton, D. A., Whitson, W., Ambrose, W. W., Uoshima, K. & Cooper, L. F. (1995) Correlative Microscopic Investigation of the interface between titanium alloy and

the osteoblast-osteoblast matrix using mineralizing cultures of primary fetal bovine mandibular osteoblasts. The *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 10:655-665.

ILUSTRAÇÕES E QUADRO

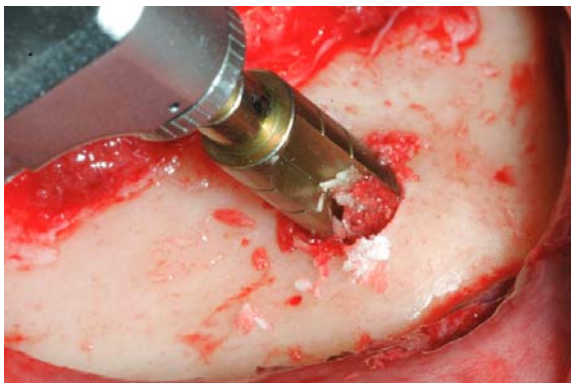


Figura 01 - Coleta de tecido ósseo da região da sínfese da mandíbula



Figura 02- Explantes sendo colocados nas garrafas de cultura celular

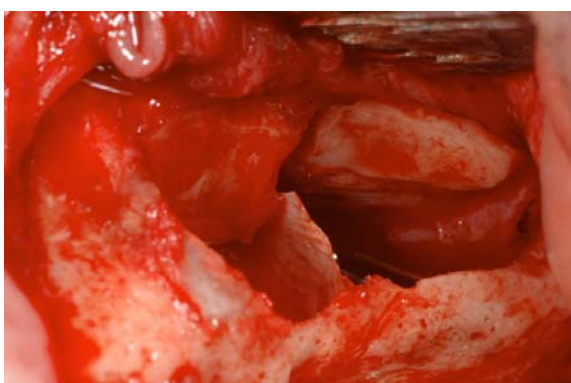


Figura 03 - Seio maxilar preparado para receber transplante de osso autólogo



Figura 04 - Transplante de osso autólogo realizado no seio maxilar

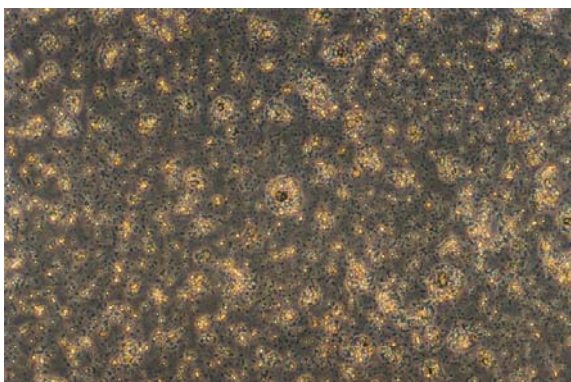


Figura 05 - Células após 02 dias em cultura primária (100 X)



Figura 06 - Células osteoblásticas-semelhantes apresentando morfologia típica de osteoblastos em cultura (100X)

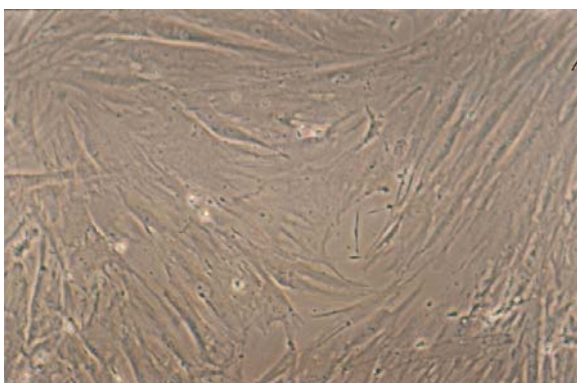


Figura 07 - Estágio de subconfluência celular atingido entre 25-40 dias (100X)

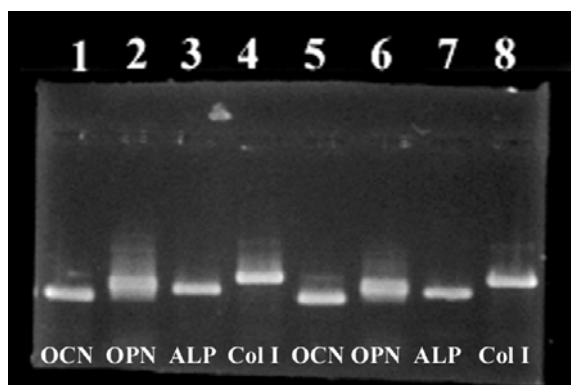


Figura 08 – Gel de agarose a 2% dos produtos da reação de RT-PCR de células osteoblásticas-semelhantes cultivadas (bandas 1, 2, 3 e 4) e controle positivo (bandas 5, 6, 7 e 8).

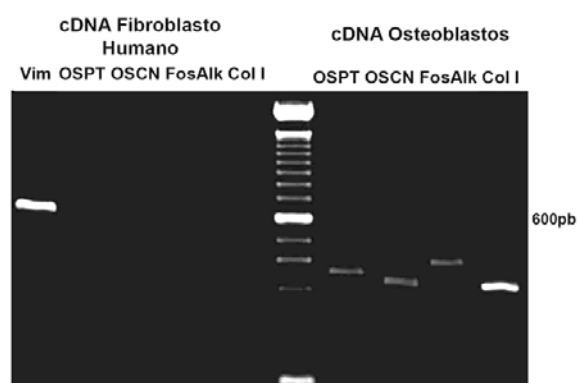


Figura 09 - Gel de agarose a 2% dos produtos da reação de RT-PCR de células osteoblásticas-semelhantes e controle negativo

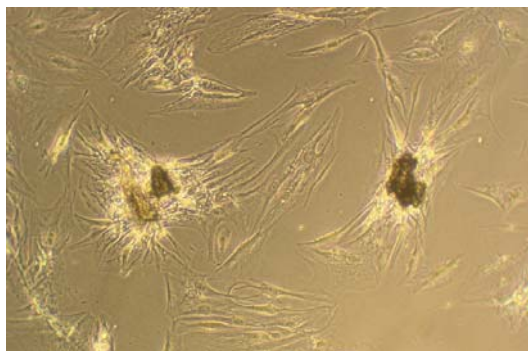


Figura 10 - Nódulos de mineralização evidenciados através de coloração de Von Kossa (100X)

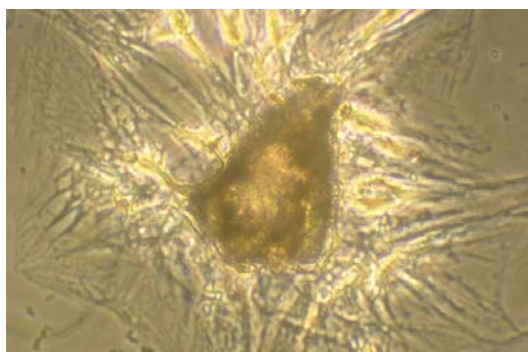


Figura 11 - Nódulo de mineralização evidenciados através de coloração de Von Kossa (400X)

	Sense	Anti-sense	Produto Esperado
Osteopontina	5'-CTA GGC ATC ACC TGT GCC ATA CC-3'	5'-CAG TGA CCA GTT CAT CAG ATT CAT C-3'	372pb
Osteocalcina	5'-ATG AGA GCC CTC ACA CTC CTC-3'	5'-GCC GTA GAA GCG CCG ATA GGC-3'	293pb
Colágeno tipo 1	5'-GGA CAC AAT GGA TTG CAA GG-3'	5'-TAA CCA CTG CTC CAC TCT GG-3'	460pb
Fosfatase Alcalina	5'-CCC AAA GGC TTC TTC TTG-3'	5'-CTG GTA GTT GTT GTG AGC-3'	356pb
Vimentina	5'-CCC TCA CCT GTG AAG TGG AT -3'	5'-CTC AAT GTC AAG GGC CAT CT -3'	672pb

Quadro 01 - Sequências dos iniciadores utilizados

ARTICLE

TITLE:

OPTIMIZED BONE TISSUE HARVESTING AND HUMAN OSTEOLAST-LIKE
PRIMARY CELL CULTURE: A BIOENGINEERING STRATEGY.

Journal: Clinical Oral Implants Research

Key words: Primary culture; osteoblasts; osteocalcin; alkaline phosphatase; osteopontin;
type I collagen.

ABSTRACT:

The objective of this study was to develop an optimized bone tissue harvesting viable protocol, by biopsy of cortical-porous bone tissue from the mandible synphises site, using dental implant drills from Bicon™ system (Boston, USA), osteoblast-like primary culture establishment and cellular line from oral cavity site. Morphological structure, mineralization production (Von Kossa), proliferation and phenotypic characterization by RT-PCR to OCN, OPN, ALP and COL I expression was analyzed. The osteoblast-like cells demonstrated OCN, OPN, ALP and ALP expression and ability to produce mineralization nodules. The results found in this study, when analyzed in conjunction, demonstrated that the cultured cells presented osteoblast in culture with morphological and phenotypic characteristics. It was possible to utilize this protocol for harvesting mandibular autogenous bone for the indicated bone reconstruction procedures and in the osteoblast-like primary culture and line establishment.

INTRODUCTION

Osseointegrated implants have been widely employed in dentistry as an adjuvant element in the rehabilitation of edentulous areas with high rates of odds. The success of such implantations depends on the effect and the correlation between various variables (Albrektsson et al. 1981). In some situations a reconstruction of the bone architecture is necessary using biomaterials, autogenous and alogenuous grafts, although there are still restrictions for all those techniques (Binderman e Fin 1990, Damien et al. 1991, Hoppenreijns et al. 1992, Assael 2003, Vacanti et al. 1998, Vacanti et al. 1999).

Scientific investigation based on osteoblasts cultures are widely used in several studies applied to implantology (Thonemann & Schmalz 2000, Freshney 1999, Pieper et al. 1999, Lee et al. 2000, Stammen et al. 2001, Pego et al. 2003, Ueda et al. 2001, Schuster et al. 2001, Schmalz 2002, Gallagher 2003, Gartland et al. 2005). However the multifaceted structure of the bone tissue, the heterogeneities of the cellular types, as well as the interconnection of the extracellular matrix and the mineral fraction, make the bone a difficult tissue to extract cells from and to study at a molecular and cellular level (Gallagher et al. 1987b). Many osteoblast cultures have been carried out through enzymatic digestion of fetal tissues (Yliheikkilä et al. 1995, Bonewald et al. 2003) or from slightly mineralized neonates tissues (Chen et. al. 2002, Aybar et al. 2004) with high cellular ability, from experimental animals, avoiding mature and mineralized human bone (Kasperk et al. 1995).

The effect of repeated subcultures in the phenotype stability of the cells derived from human bone have also been studied along with evidences that these cells loose their osteoblast-like characteristic (Gartland et al. 2005), factor that implies in controversies when results obtained from studies using cells of subsequent passage to secondary culture are extrapolated (Açil et al. 2000, Mauney et al. 2004, Mailhot & Borke 1998, Malekzadeh et al. 1998, Jonsson et al. 1999, Gruber et al. 2002, Rheuter et al. 2003).

The achievement of a new bone to restore the function of damaged and traumatized bones or bone loss is a clinical necessity, and of a great socio economic importance. The bone tissue engineering is known as an alternative strategy for bone regeneration, through the combination of mature or progenitor cells with biocompatible materials or matrix with appropriate factors of growth, providing its repair and regeneration (Brown & Porter 2000).

The objective of this study was to develop an optimized bone tissue harvesting viable protocol, using dental implants drills from Bycon™ system (Boston, USA), osteoblast-like primary culture establishment and cellular line from oral cavity site.

MATERIAL AND METHODS

For the establishing of the proposed protocol, materials from 15 patients had been collected from different donor sites, extraction models, culture media, supplementation and type of recipient (data not shown).

PATIENTS

Bone samples were obtained by biopsy of cortical-porous bone tissue from the mandible synphises site using dental implant drills from Bicon™ system (Boston, USA), with an electric engine in 50 RPM (Fig. 01). Three patients were selected, two females, one 24 years old and the other 37 years old, and one 37 year-old male. Anamneses data revealed a normal systemic state and the non intake of any medicines was reported. All patients were referred to surgical removal of the cortical-porous block indicated for the use as an autogenous graft material for oral cavity reconstructive procedures. Prior to the surgical procedures, patients were informed about the project and have opted to be part on their free will, signing at an informed consent (research protocol number 101/2004, approved in April, 26th 2004, by the Federal University of Santa Catarina State Commission of Ethics in Research for human tissue specimens).

After the explants collection, they were washed in sterile saline solution several times at room temperature and placed at cellular culture flasks of 25cm² (Fig. 02), with a culture medium Ham F12 (Cultilab, Campinas, Brasil) with antibiotics and antifungal (gentamicine sulfate (50mg/l) and anfotericine B (2mg/l)), supplemented with 12% of bovine fetal serum (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) and transferred to the Applied Virology Laboratory of UFSC.

Primary culture and establishing of cellular lineage.

The basic protocol utilized was the one established by Freshney, in 1999. Alterations in this protocol were performed during the study in accordance with the needs, difficulties and opportunities found on the carry out of the study.

The collected samples were washed in Tyrode solution, bone particles were separated in medium Ham F12 with antibiotics and antifungal (gentamicine sulfate (50mg/l) and anfotericine B (2mg/l)) and supplemented with bovine fetal serum 12% (complete medium), and placed at sterile cellular culture flasks (25cm²), adding 4ml of digestive solution (solution A: 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 0,05g NaH₂PO₄H₂O in 100ml of distilled water; solution B: collagenase - trypsin solution dissolved in 137mg of Collagen type I (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) and 50mg trypsin type III (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) in 10ml of solution A. The pH was adjusted in 7.2 and completed for 100ml with distilled water. The distilled water was sterilized with a filter and distributed in 10ml aliquots, and stored at -20°C temperature). This solution was added to the flasks, covering the bone specimens. The solution was mixed on a “Hot Rock” stirrer model RP-50 (Elmeco, USA) at room temperature for 30min. Released cells were suspended and discarded, since such cells could contain fibroblasts. A second aliquot of 4ml was added to the solution of bone fragment digestion and stirred for 30 min at room temperature. The solution of bone fragment digest was harvest and centrifuged for 2 min at 580Xg room temperature. After the supernatant was removed, cells

were added to 4ml medium Ham F12 with antibiotic and antifungal (gentamicine sulfate (50mg/l) and anphotericine B (2mg/l)), supplemented with 20% bovine fetal serum. Cells were centrifuged again at 580Xg for 10min and resuspended in 4ml of the complete media and placed in flasks of 25cm². In the meantime, 4ml of the reminiscent bone fragment digestion solution was added and the digest was repeated for 30min; and the released cells were harvested.

The flasks were horizontally positioned to be incubated at 5% CO₂ (Nuaire TM US Autoflow CO2 Water Jacketed Incubator, EUA), 37°C, from 5 to 7 days; during this period the cellular growth was checked using microscope phase contrast microscope (X 40 and X200, Olympus, Japan). The flasks media were substitute to fresh complete medium when necessary (almost twice a week). The culture media change was carried out by observing the color alteration, indicating metabolic cellular activity, pH alteration and consequently a need for medium substitution.

When subconfluence was reached at nearly 80%, the cellular coverage was trypsin-hydrolyzed with 0.25% trypsin (trypsin: EDTA 1: 250), in order to obtain cellular isolation and this primary culture was sub-cultivated in a 1:1 ratio, at subsequent passages. Later, the cellular lineage was established from the primary culture of the three selected patients.

Follow up of the proliferation and cell morphological aspect.

The cultured cells were observed, monitored and photographs were taken (X100 and X400) by inverted contrast-phase microscope (Olympus CK 40) every three days with posterior medium change.

The images were analyzed for follow up of cells morphological features until they reached a subconfluence stage, at which trypsin-hydrolyzes were performed and respective

passages were carried out. Primary and secondary cultures were photographed for posterior comparison with literature data.

Phenotype characterization of the established lineage.

Experiments were carried out on the established lineages, at the first passage (P1) for the detection of certain proteins by RT-PCR reaction. The reaction of PCR was preceded of a reverse transcription phase for complementary DNA synthesis. The signals were compared with a positive control (human bone tissue) and a negative control (fibroblast from human gum).

Total RNAs extraction.

Cells were cultured until subconfluence was reached. After this period, the culture media were removed and the total RNAs were extracted using TRIzol™ (Invitrogen, USA) reagent in accordance with the manufacturer instructions. RNAs concentrations were estimated by spectrophotometer in UV at 260nm.

cDNA synthesis – reverse transcription

The complementary DNA stripe (cDNA) was synthesized from 1, 0 µg total RNA, obtained from the extraction with TRIzol™ using a reverse transcription kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen, USA), in accordance with the manufacturer instructions.

RT-PCR Reaction

For the RT-PCR the cDNA was diluted in 1:5, and then utilized 2µl of the diluted cDNA in a reaction of 25µl, using 1 unit of DNA polymerase enzyme. The amplification occurred in 30 cycles (denaturation at 94°C for 1min; annealing at 58°C during 1min and extension at 72°C for 1,5min) with a initial phase of denaturation at 94°C for 2min and an extend final phase at 72°C for 7min. PCR product was visualized in agarose gel 2% (Sigma,

Sigma Chemical CO., EUA) stained with ethyd bromide (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) and pictures were taken using a digital system of analysis (EDAS290 Kodak). As a negative control human fibroblast were used, obtained from primary cultures of gum tissue (Coura et al., 2006).

Primers obtained from the sequence of human mRNA of ALP, OPN, OCN, COL I and Vimentin (VIM) were available on the data bank from the “*National Center for Biotechnology Information*”¹. The chosen sequences (scheme 01) were tested by using the program for analysis of *primers* Oligo-6™ purchased from Invitrogen (Invitrogen, USA). Two measurements were taken in each established lineage.

Mineralization Essay

Osteoblasts were cultured at the first passage in 24-well culture plates at a cell density of 2×10^4 cells per wells in an entire culture media. For adherence, cells were kept in medium only for a day (designated day 0); cells were then cultured in mineralization medium (complete medium, 100µg/ml of ascorbic acid (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) and 10mM of β-glycerophosphate (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA)). The mineralized medium was changed at days 2, 5, 8 and 10, and mineralized nodules were developed at day 12 through Von Kossa staining technique for the assessment of phosphate, according to the protocol described by Bonewald et al. (2003). The mineralized nodules were observed by using phase contrast microscope (microscope Olympus model CK 40). Images were obtained through digital camera Olympus model C-5060 (X100 and X400). The procedure was three folded for each established lineage.

RESULTS

¹ (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Sample attainment.

The autogenous material obtained could be used at foreseen regenerative procedures (Fig. 03 and 04) and in primary culture and osteoblast-like cell lineages establishing. There was no need of fragments being diced into pieces after their removal from the dental implant drills.

Primary culture attainment, cell proliferation and morphological aspect follow up and cell lineage establishing.

The typical morphology for osteoblasts in culture (elongate polygonal cells) was observed between the 10th and 15th day (Fig. 06). From this moment on, a heighten proliferation had occurred until cells have reached a subconfluence phase of nearly 80%, between days 25-40 (Fig. 07), when the trypsinization was performed with trypsin at 0.25% (trypsin: EDTA 1: 250), characterizing the first passage and late establishing cellular lineage designated NNGZ-1, NNGZ-2 and NNGZ-3, originated from the primary culture of the three selected patients.

In the secondary cultures, cells have already presented characteristic morphology in the 3rd day with high cellular proliferation, forming cellular clusters of difficult individualization at the 5th day. At day 12, cells were organized and have clustered in groups of high cellular density but spaces could not be observed among the groups of cells.

Phenotype assessment of cultured cells.

Figure 08 shows markers of lanes corresponding to OPN, OCN, ALP and COL I, indicating their presence at cultured osteoblast-like cells (lanes 1-4) as much as at the human bone tissue (positive control; lanes 5-8). Figure 09 shows that for fibroblasts of human gum (Coura et al. 2006) there was no expression of OPN, OCN, ALP and COL I, but only of VIM (Meazzini et al. 1988, Shapiro et al. 1995).

Mineralization essay

It was demonstrated that the cells formed calcification areas of various degrees, characteristic of osteoblastic cells in culture (Fig. 10 and 11), also called calcification nodules, which were evidenced by Von Kossa staining.

DISCUSSION

The cellular culture model has been widely undertaken for the investigation of bone biology (Gartland et al. 2005). However it is difficult to extract cells from bone tissue (Gallagher et al. 1987a). Therefore, a highly cellular and little mineralized bone model has been used from fetal animal calvarium (Yliheikkilä et al. 1995, Bonewald et al. 2003) and neonates (Chen et al. 2002, Aybar et al. 2004) in order to study the bone tissue at cellular and molecular level. Concerning studies *in vitro* of oral cavity, isolated human bone cells have been utilized, originating from other sites (Malekzadeh et al. 1998, Jonsson et al. 1999, Açil et al. 2000, Gruber et al. 2002, Van Griensven et al. 2002, Silva et al. 2003, Miyamoto et al. 2004, Springer et al. 2004, Beloti & Rosa 2005) such as osteosarcoma cloned cells (Gartland et al. 2005) or primary cultures obtained from other regions (Mauney et al. 2004, Açil et al. 2000, Gruber et al. 2002, Chen et al. 2002). There are some limitations in the use of these models such as phenotype differences, origin, cellular subtypes and pathophysiological characteristic that generate restrictions in the transposition of outcomes for the cellular activity *in vivo* (Kasperk et al. 1995). Therefore it is imperative for the development and the improvement of primary cultures that tissues are obtained from its own oral cavity.

The protocol with primary culture employed at this work, was initially proposed by

Freshney (1999), which was carried out and described with some changes, has not yet been reported by other Brazilian researchers, therefore it is the first protocol for the attainment of primary culture and establishment of cell lineages from oral cavity achieved in the whole country. Through this, the use of bone fragments was made possible as much as for the primary culture and cellular amplification, as well as in the reconstructive procedures that were planned for the patients. The used autogenous material, probably, presented greater volume and viable number than those which were likely to be obtained by bone traps, trephines, surgical curettes and bone-forceps, with the use of bone mill to cut the bone core into smaller bone chips, for oral reconstructive bone procedures (Springer et al. 2004). These data must be confirmed in further studies through out specific tests.

The use of bone from the oral cavity as a source of primary cultures, in such modality of studies, has been referred by many authors (Guerriero et al. 1995, Mailhot & Borke 1998, Rheuter et al. 2003). However, an extensive number of samples remain a problem from the ethical point of view (Springer et al. 2004). Bone chips obtained from dental drills have been previously utilized as a source of attainment of primary culture cells (Mailhot & Borke1998). Nevertheless, such dental drills were used on the preparation of implant sites, but the features for their collect were not cited. In general, the preparation for the implant site is performed with rotations of 1800 rpm, copiously irrigated, therefore not favoring the bone tissue collect. The dental implant drills which were used in this work have shown to be very effective at the collection with good handling of the fragments of the bone tissues, by their physical features, and by the fact they were utilized in low rotation (50rpm), besides of the possibility of being used without irrigation.

In general, osteoblast-like cells in culture present typical morphology, but the shape varies according to the donors, from fibroblastic-like to elongate polygonal shape (Malekzadeh et al. 1998, Gallagher 2003, Aybar et al. 2004). In this work such morphology

was revealed between the 10th to the 15th day and the subconfluence phase was reached between day 25 and 40, in accordance with data from the literature (Gartland et al. 2005). It has been observed that the age of the donor had influenced the outcomes, leading to typical morphology and the subconfluence phase to be delayed on both elder patients. Those data need to be further analyzed in additional investigations, having in mind that other variables may be influencing these results.

Cells were characterized phenotypically at the first passage (P1), taking into consideration that there are evidences of phenotypic stability loss of cells derived from human bone after repeated subcultures (Gartland et al. 2005). Many experiments with osteoblast in culture have utilized P1 (Yliheikkilä et al. 1995, Guerriero et al. 1995, Jonsson et al. 1999, Chen et al. 2002, Aybar et al. 2004, Springer et al. 2004), but other authors have reported the usage of subsequent passage cells (Malekzadeh et al. 1998, Mailhot & Borke 1998, Açıl et al. 2000, Gruber et al. 2002, Rheuter et al. 2003, Mauney et al. 2004). At practical terms, the loss of phenotypical stability presents real difficulties, having in mind that the attainment of a great number of cells from a single donor is desired, possibly in protocols of enzymatic digestion of bone tissues just after several subcultures are performed.

The available evidences point out that cells cultures originated from human cells contain cells of osteogenic lineage in different phases of differentiation and maturation. Molecule markers were employed in this research for some proteins which are associated with the bone tissue and that have been described as suitable for osteoblastic characterization. Due to positive results which were obtained through the reactions of RT-PCR for OPN, OCN, ALP and COL I, proteins expression were possible to be confirmed at the established cultures taking place at osteoblastic differentiation and maturation phases. Other authors have also utilized markers for OPN (Ivanovski et al. 2001), OCN (Doglioli & Scortecchi 1991, Mailhot & Borke 1998, Ma et al. 2001, Açıl et al. 2000, Ivanovski et al. 2001, Yang et al. 2001,

Yamada et al. 2003, Nieden et al. 2003, Reuther et al. 2003), ALP (Pinero et al. 1995, Mailhot & Borke 1998, Ivanovski et al. 2001) and COL I (Mailhot & Borke 1998, Yang et al. 2001, Van Griensven et al. 2002, Ishino et al. 2003) for osteoblastic characterization and findings from this work were similar to all the above mentioned authors.

The success on the cultivation of any type of cells may only be reached if there is a specific phenotype marker, enabling to confirm the identity of cells *in vitro*, and in terms of osteoblastic cultures, the osteocalcin is without doubt considered as the most specific marker for osteoblastic phenotype (Ivanovski et al. 2001, Gallagher 2003, Gartland et al. 2005), therefore the expression of this protein has been evidenced in the cultivated cells.

The positive markers found at reactions of RT-PCR were very similar to those of the bone tissue (positive control), being considered as one more proof of the osteoblast phenotypic characteristic of cells from established cultures (Fig. 08).

As counterevidence, a reaction of RT-PCR for the same markers was performed, adding VIM (intermediate filament protein of cytoskeleton from mesenchymal cell types) for the negative control (human gingival fibroblasts). As VIM expression only occurred on cells utilized as negative control (Meazzini et al. 1998; Shapiro et al. 1995), the hypothesis of characterizing established culture cells as fibroblastic-like was discarded (Fig. 09).

The Von Kossa staining has been used to verify the capability of cells to produce mineralization nodules (Mailhot & Borke 1998, Yang et al. 2001, Ivanovski et al. 2001, Nieden et al. 2003, Cheng et al. 1994) and our findings corroborates with the results obtained at these researches, in which osteoblastic-like cells obtained from the cultures have also formed nodules of mineralization *in vitro*.

The formation of nodules of mineralization *in vitro* (Fig. 10) was an evidence that active osteoblastic differentiation may occur in osteoblast-like human cell cultures obtained from the

oral cavity on the presence of β -glycerophosphate and Ascorbate, through the proposed protocol. However, so that cultured cells, in the intent to form bone tissue may be employed in tissue engineering, it is essential that they are able to form mineralized matrix *in vivo* (Malekzadeh et al. 1998). Further investigations are needed in order to demonstrate that these cells originate a similar bone to the one formed *in vivo*, and consequently been able to be clinically applied in strategies of tissue engineering.

Osteoblastic-like cells treated with glycocorticoids at a first passage (Guerriero et al. 1995, Beloti & Rosa 2005), at this work showed a specific mineralization pattern with “spots” (Fig. 11). Those spot-like patterns of mineralization are also reported in the literature, presenting similar quantities to the extra-cellular matrix and alkaline phosphate activity alike to those treated with glycocorticoids since the primary culture (Açil et al. 2000) and ascorbate (Mailhot & Borke 1998, Malekzadeh et al. 1998, Açil et al. 2000, Silva et al. 2003, Gallagher 2003).

L-ascorbic acid added to the cultures derivative from human bone at secondary culture (Guerriero et al. 1995) have increased the proliferation and the secretion of collagen type I. Also, there was an increase of the synthesis of non-collagen proteins (especially osteocalcin and bone sialoprotein) in addition to an increase deposition of the matrix (Gartland et al. 2005). Some works suggest the application of ascorbate since the primary culture (Mailhot & Borke 1998, Gallagher 2003, Malekzadeh et al. 1998, Açil et al. 2000, Silva et al. 2003) so to better employ its properties. The presence or the absence of calcium and/or ascorbate in the medium of the expansion has been implied as the possible bone cells modulating progression from human mandible, on a highly undifferentiated proliferated condition for the mature osteoblastic phenotype (Guerriero et al. 1995). Nevertheless, the absence of these supplements did not show to be a cutting point for the assessment of the protein expressions under analysis. Other authors have also analyzed the expression of ALP (Ivanovski et al.

2001, Aybar et al. 2004), OCN (Ivanovski et al. 2001, Aybar et al. 2004) and OPN (Ivanovski et al. 2001), through RT-PCR (Ivanovski et al. 2001) ,without supplementing the culture medium with ascorbates and glycocorticoids.

Our results, when clustered for analysis showed that cultivated cells present morphological and phenotypic osteoblast characteristics in culture. This optimized model of harvesting bone tissue from the oral cavity provides favorable conditions for the isolation and culture of cells that may be useful in the development of new biomaterials, in the confirmation and development of cell therapy protocols applied to the implantodonty and at the guided bone regeneration.

This protocol can also be applied as a strategy of bone bioengineering, at regenerative procedures, when reconstruction of bone structure is required for dental implants. Although, great breakthroughs have been advancing towards the bone biology, future steps should be taken so that a better comprehension of what is really needed to develop a bone, obtained through tissue engineering, with possible clinical applications.

REFERENCES

- Açil, Y., Terheyden, H., Dunsche, A., Fleiner, B. & Jepsen, S. (2000) Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *Journal of Biomedical Materials Research* 4:703-710.
- Albrektsson, T., Branemark, P. I., Hansson, H. A. & Lindstron J. (1981) Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 52:155-170.
- Assael, L. A. (2003) The promise os tissue engineering. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 61(2):155-156.
- Aybar, B., Bilir, A., Akçakaya, H. & Ceyhan, T. (2004) Effects of tricalcium phosphate bone graft material on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clinical Oral Implants Research* 15:119-125.
- Beloti, M. M. & Rosa, A. L. (2005) Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Brazilian Dental journal* 16(2):156-161.

Binderman, I. & Fin, N. (1990) Bone substitutes organic, inorganic, and polymeric: cell material interactions. In: Yamamuro, T., Hench, L. & Wilson J, (Ed.). *CRC Handbook of Bioactive Ceramics*. p.45–51. Boca Raton: CRC Press.

Bonewald, L. F., Harris, S. E., Rosser, J., Dallas, M. R., Dallas, S. L., Camacho, N. P., Boyan, B. & Boskey, A. (2003) Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization *in vitro* represents bone formation. *Calcif Tissue Int* 72:537-547.

Brown, R. A. & Porter, R. A. (2000) Tissue engineering. In: Masters, J.R.W. *Animal Cell Culture*. 3rd. edition, cap. 6. Oxford: Oxford University press.

Chen, F., Mao, T., Tao, K., Chen, S., Ding, G. & Gu, X. (2002) Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 60:1155-1159.

Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F. & Avioli, L. V. (1994) Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134: 277-286.

Coura, G. S., Zortéa Junior, A. J., Savi, L. A., Simões, C. M. O. & Magini R. S. (2005) Protocolo preliminar de cultura de fibroblastos gengivais humanos. *Revista Brasileira de Implantodontia & Prótese sobre Implantes* 12(47/48):190-196.

Coura, G. S.; Zortéa Júnior, A. J.; Savi, L. A.; Magini, R. S. & Simões, C. M. O. (2006) Protocol of human gingival fibroblast culture. evaluation of cell viability and potential DNA cellular damage. *Brazilian Dental Journal*, Ribeirão Preto. No prelo.

Damien, J. C. & Parson, J. R. (1991) Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *Journal Applied Biomaterials* 2:187–208.

Doglioli, P. & Scortecchi, G. (1991) Characterization of endosteal osteoblasts isolated from human maxilla and mandible: an experimental system for biocompatibility tests. *Cytotechnology* 7(1): 39-48.

Freshney, R. I. (1999) Culture of Animal Cells. *A Multimedia Guide*. New York: Wiley-Liss, Cd-Rom

Gallagher, J. A. (2003) Human osteoblast culture. In: Helfrich, M. H. & Ralston, S. H., Ed. *Bone Research Protocols*, NJ.29- 51. Humana: Totowa.

Gallagher, J. A., Beresford, J. N., Caswell, A., Russell, R. G. G., Kasperk, C., Wergedal, J., Strong, D., Farley, J., Wangerin, K., Gropp, H. & Ziegler, R. (1987a) Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *Journal of Clinical Endocrinology an Metabolism* 80:2511-2517.

Gallagher, J. A., Beresford, J. N., Caswell, A. & Russell, R. G. G. (1987b) Subcellular investigations of skeletal tissue. In: Peters, T. J., ed. *Subcellular Pathology of systemic disease*, p.377–397. London: Chapman and Hall.

Gartland, A., Buckley, K. A., Dillon, J. P., Curran, J. M., Hunt, J. A. & Gallagher, J. A. (2005) Isolation and culture of human osteoblasts. . In: PICOT, Joanna (Ed.). *Human cell*

culture protocols. 2nd edition, p.29-54. Totowa, NJ: Humana. (Methods in molecular medicine, v.107)

Gruber, R., Varga, F., Fischer, M. B. & Watzek, G. (2002) Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clinical Oral Implants Research*, 13:529-535.

Guerriero, C., De Santis, D., Nocini, P. F., Gotte, P. & Armato, U. T. (1995) Tissue culture of adult human osteoblasts isolated from jaw bones. *Italian Journal of Anatomy Embryology*. 100(1):83-93. Suppl.

Hoppenreijts, T. J., Nijdam, E. S. & Freihofer, H. P. (1992) The chin as a donor site in early secondary osteoplasty: a retrospective clinical and radiological evaluation. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery* 20: 119–124.

Ishino, T., Yajin, K., Takeno, S., Furukido, K. & Hirakawa, K. (2003) Establishment of osteoblast culture from human ethmoidal sinus. *Auris, Nasus, Larynx*. 30(1):45-51.

Ivanovski, S., Li, H., Haase, H. R. & Bartold, P. M. (2001) Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 36:131-131.

Jonsson, K. B., Frost, A., Nilsson, O., Ljunghall, S. & Ljunggren, O. (1999) Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 70(4):365-373.

Kasperk, C., Wergedal, J., Strong, D., Farley, J., Wangerin, K., Gropp, H., Ziegler, R. & Baylink, D. J. (1995) Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Chevy Chase*, 80:2511-2517.

Keller, J. C., Collins, J. G., Gabrielle, G. N. & McGee, T. D. (1997) In vitro attachment of osteoblast-like cells to osteoceramic materials. *Dental Materials, Kidlington*, 13:62-68.

Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir K. H. & Mooney, D. J. (2000) Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules* 33:4291-4294.

Ma, P. X., Zhang, R., Xiao, G. & Franceschi, R. (2001) Engineering new bone tissue *in vitro* on highly porous poly (Hydroxyl acids) / hydroxylapatite composite scaffolds. *Journal of Biomedical Material Research* 54:284-293.

Mailhot, J. M. & Borke, J. L. (1998) An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. *Clinical Oral Implants Research, Copenhagen*, 9(1):43-50.

Malekzadeh, R., Hollinger, J. O., Buck, D., Adams, D. F. & McAllister, B. S. (1998) Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *Journal of Periodontology* 69:1256-1262.

Mauney, J. R., Blumberg, J., Pirun, M., Volloch, V., Vunjak-Novakovic, G. & Kaplan, D. L. (2004) Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds *in vitro*. *Tissue Engineering*, 10(1/2): 81-92.

Meazzini, M. C., Toma, C. D., Schaffer, J. L., Gray, M. L. & Gerstenfeld, L. C. (1998) Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain *in vitro*. *Journal of Orthopaedic Research*, Hoboken, n.16, p.170–180.

Miyamoto, I., Tsuboi, Y., Takahashi, K., Hyon, S. H. & Iizuka, T. (2004) Enhancement of bone volume in guided bone augmentation by cell transplants derived from periosteum: an experimental study in rabbit calvarium bone. *Clinical Oral Implants Research*, Copenhagen, n.15, p.308-314.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. In: < www.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed in: 20 jun. 2005.

Nieden, N. I. Z., Kempka, G. & Ahr, H. J. (2003) *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 71:18-27.

Pego, A. P., Poot, A., Grijma, D. & Feijen, J. (2003) Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. *Journal of Controlled Release* 87:69-79.

Pieper, J. S., Oosterhof, A., Dijkstra, P. J., Veerkamp, J. H. & Kuppevelt, T. H. (1999) Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* 20:847-848.

Pinero, G. J., Farach-Carson, M. C., Devoll, R. E., Aubin, J. E., Brunn, J. C. & Butler, W. T. (1995) Bone matrix proteins in osteogenesis and remodeling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Archives of Oral Biology*, Oxford, n.40, p.145-155, 1995.

Reuther, T., Kohl, A., Komposch, G. & Tomakidi, P. (2003) Morphogenesis and proliferation in mono- and organotypic co-cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and alveolar bone cells. *Cell and Tissue Research*, 312:189–196.

Schmalz, G. (2002) Materials science: biological aspects. *Journal of Dental Research* 81(10):660-663

Schuster, U., Schmalz, G., Thonemann, B., Mendel, N. & Metzl, C. (2001) Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *Journal of Endodontics*, 27:259–265.

Shapiro, F., Cahill, C., Malatantis, G. & Nayak, R. C. (1995) Transmission electron microscopic demonstration of vimentin in rat osteoblast and osteocyte cell bodies and processes using the immunogold technique. *Anatomical Record*, 241:39–48.

Silva, M. H. P., Soares, G. D. A., Elias, C. N., Best, S. M., Gibson, I. R., Disilvio, L. & Dalby, M. J. (2003) *In vitro* cellular response to titanium electrochemically coated with hydroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness. *Journal of Materials Sciences*, 14:511-519.

Springer, I. N. G., Terheyden, H., Geib, S., Harle, F., Hedderich, J. & Açil, Y. (2004) Particulated bone grafts-effectiveness of bone cell supply. *Clinical Oral Implants Research* 15(2):205-215.

- Stammen, J. A., Willians, S., Ku, D. & Gulberg, R. E. (2001) Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterial* 22:799-806.
- Thonemann, B. & Schmalz, G. (2000) Immobilization of bovine dental papilla cells with simian virus 40 large T antigen. *Archives of Oral Biology, Oxford*, 45:857–869.
- Ueda, M., Tohnai, I., Nakai, H. (2001) Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artificial. Organs*. 25(3):164-171.
- Vacanti, J. P. (1998) Beyond transplantation. *Archives of Surgery, Chicago*, 123:545–549.
- Vacanti, M. D., Charles A. & Bonassar, L. J. (1999) An overview of tissue engineered bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*,. 367S:375-381.
- Van Griensven, M., Zeichen, J., Tschernig, T., Seekamp, A. & Pape, H. C. (2002) A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue specimens using fibrin glue. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 54(1):25-29.
- Yamada, Y., Boo, J. S., Ozawa, R., Nagasaka, T., Okazaki, Y., Hata, K. I. & Ueda, M. (2003) Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 31(1):27-33.
- Yang, X. B., Roach, H. I., Clarke, N. M. P., Howdle, S. M., Quirk, R., Shakesheff, K. M. & Oreffo, R. O. C. (2001) Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone* 29:523-531.
- Yliheikkilä, P. K., Felton, D. A., Whitson, W., Ambrose, W. W., Uoshima, K. & Cooper, L. F. (1995) Correlative Microscopic Investigation of the interface between titanium alloy and the osteoblast-osteoblast matrix using mineralizing cultures of primary fetal bovine mandibular osteoblasts. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 10:655-665.

ILUSTRATIONS AND TABLE

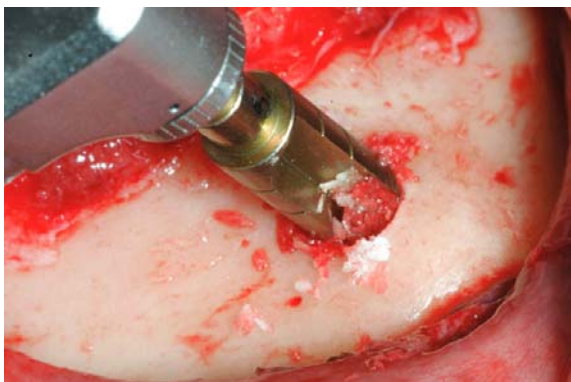


Figure 01 - Bone tissue harvesting at the mandibular symphysis site



Figure 02- Explants being placed into cell culture flasks.

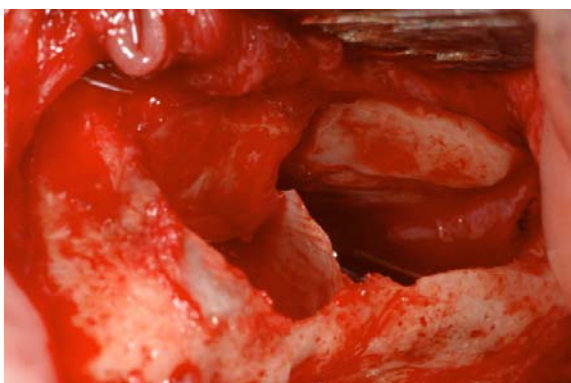


Figure 03 - Maxillary sinus prepared to receive autogenous bone transplant.



Figure 04 - Autogenous bone transplant performed at the maxillary sinus.

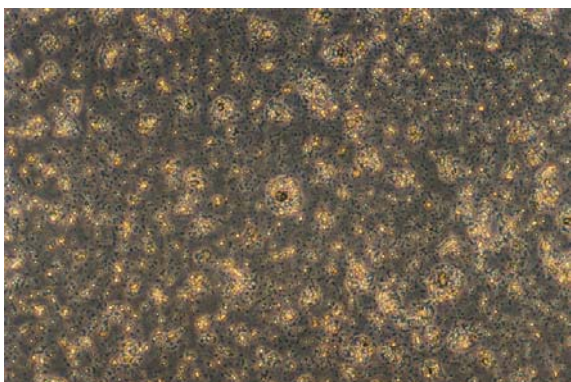


Figure 05 - Cells after 02 days in primary culture (100 X)



Figure 06 - Osteoblast-like cells showing typical morphology of osteoblasts in culture (100X)

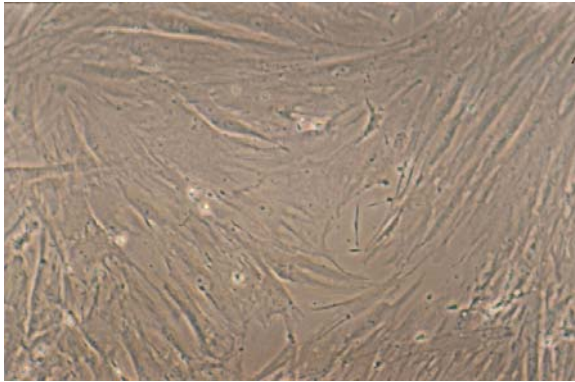


Figure 07 - Cellular subconfluence phase achieved between 25-40 days (100X)

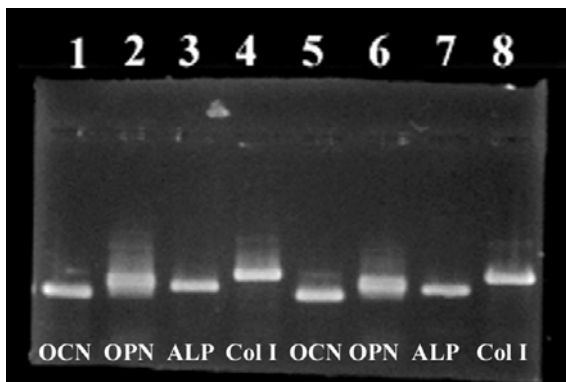


Figure 08 – Agarose gel in 2% of products from RT-PCR reaction of cultures osteoblastic-like cells (lanes 1, 2, 3 and 4) and positive control (lanes 5, 6, 7 and 8).

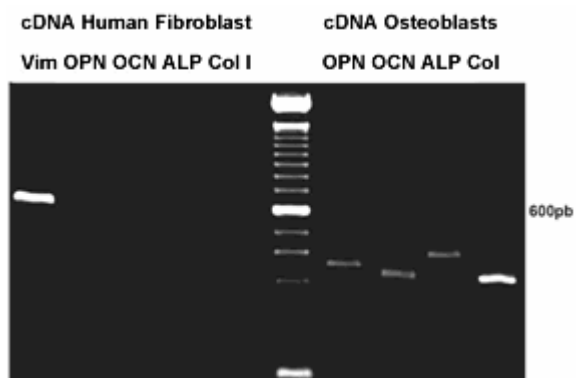


Figure 09 - Agarose gel in 2% of products from RT-PCR reaction of cultures osteoblastic-like cells and negative control.

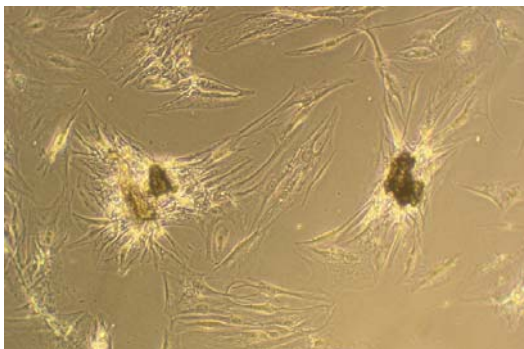


Figure 10 - Mineralization nodules evidenced by Von Kossa staining (100X)

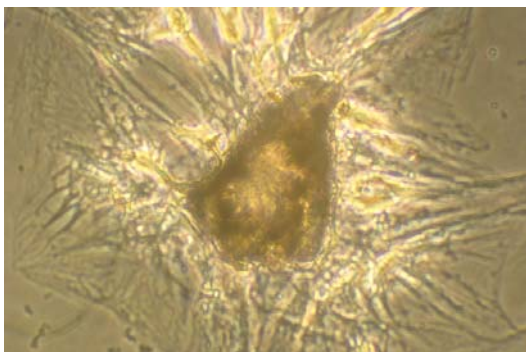


Figure 11 - Mineralization nodules evidenced by Von Kossa staining (400X)

	Sense	Anti-sense	Spected Product
Osteopontin	5'-CTA GGC ATC ACC TGT GCC ATA CC-3'	5'-CAG TGA CCA GTT CAT CAG ATT CAT C-3'	372pb
Osteocalcin	5'-ATG AGA GCC CTC ACA CTC CTC-3'	5'-GCC GTA GAA GCG CCG ATA GGC-3'	293pb
Type 1 Collagn	5'-GGA CAC AAT GGA TTG CAA GG-3'	5'-TAA CCA CTG CTC CAC TCT GG-3'	460pb
Alkaline Phosphatase	5'-CCC AAA GGC TTC TTC TTG-3'	5'-CTG GTA GTT GTT GTG AGC-3'	356pb
Vimentin	5'-CCC TCA CCT GTG AAG TGG AT -3'	5'-CTC AAT GTC AAG GGC CAT CT -3'	672pb

Table 01 – Primers sequence used at the study.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AÇIL, Y. A. et al. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, n.4, p.703-710, 2000.

ADELL, R. et al. Reconstruction of severely resorbed edentulous maxillae using osseointegrated fixtures in immediate autogenous bone grafts. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, n.5, p.233, 1990.

ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, n.52, p.155-170, 1981.

ASSAEL, L. A. The promise of tissue engineering. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v.61, n.2, p.155-156, 2003.

AYBAR, B. et al. Effects of tricalcium phosphate bone graft material on primary cultures of osteoblast cells in vitro. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, n.15, v.119-125, 2004.

BAUME, L. J.; HOLZ, J.; FIORE DONNO, G. Produits intermediaires d'obturation soumis au test biologique normalise: Biological testing of intermediate lining substances. **Journal - Canadian Dental Association**, Ottawa, n.38, p.18-27, 1972.

BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.16, n.2, p.156-161, 2005.

BINDERMAN, I.; FIN, N. Bone substitutes organic, inorganic, and polymeric: cell material interactions. In: YAMAMURO, T.; HENCH, L.; WILSON, J. **CRC : handbook of bioactive ceramics**. Boca Raton,: CRC Press, 1990. p.45-51.

BROWN, R. A.; PORTER, R. A. Tissue engineering. In: MASTERS, J. R. W. **Animal Cell Culture**. 3.ed. Oxford: Oxford University press, 2000. cap. 6.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside the organism. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.15, p.516-528, 1912.

CARTWRIGHT, T.; SHAH, G. P. Culture media. In: DAVIES, J. M. **Basic Cell Culture**. Oxford: Oxford University Press, 1996. p.57-91.

CHEN, F. et al. Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, n.60, p.1155-1159, 2002.

DAMIEN, J. C.; PARSON, J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **Journal of Applied Biomaterials**, New York, n.2, p.187-208, 1991.

DECUP, F. et al. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, n.4, p.110–119, 2000.

DOGLIOLI, P.; SCORTECCI, G. Characterization of endosteal osteoblasts isolated from human maxilla and mandible: an experimental system for biocompatibility tests. **Cytotechnology**, Dordrecht, v.7, n.1, p.39-48, Sep. 1991.

FRESHNEY, R. I. **Biology of the cultured cell**: a manual of basic technique. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1990. p.347.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a multimedia guide. New York: Wiley-Liss, 1999. 1 CD-ROM.

GALLAGHER, J. A. Human osteoblast culture. In: HELFRICH, M. H.; RALSTON, S. H. **Bone Research Protocols**. Totowa: Humana, 2003. NJ.29- 51.

GARANT, P. R. **Oral cells and tissues**. Illinois: Quintessence, 2003. p195-226.

GARTLAND, A. et al. Isolation and culture of human osteoblasts. In: PICOT, Joanna (Ed.). **Human cell culture protocols**. 2. ed. Totowa: Humana, 2005. p.29-54. (Methods in molecular medicine, v.107)

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Research**, Chicago, v.12, p.364-365, 1952.

GRUBER, R. et al. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, n.13, p.529-535, 2002.

GUERRIERO, C. et al. Tissue culture of adult human osteoblasts isolated from jaw bones. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, Firenze, v.100, n.1, p.83-93, 1995. [Suppl.].

HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 4, p.140-143, 1907.

HOPPENREIJS, T. J.; NIJDAM, E.S.; FREIHOFER, H.P. The chin as a donor site in early secondary osteoplasty: a retrospective clinical and radiological evaluation. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, Edinburgh, n.20, p.119–124, 1992.

ISHINO, T. et al. Establishment of osteoblast culture from human ethmoidal sinus. **Auris, Nasus, Larynx**, Amsterdam, v.30, n.1, p.45-51, Feb. 2003.

IVANOVSKI, S. et al. (2001) Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v.36, p.131-131., 2001.

JONSSON, K. B. et al. Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, v.70, n.4, p.365-373, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.142.

KASPERK, C. et al. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, n.80, p.2511-2517, 1995.

KAWAHARA, H.; SHIOTA, M.; YAMAKAWA, Y. Studies on the effects of dental metals upon the mesenchymal cells in tissue culture. **Journal of the Osaka Odontology Society**, Oslo, n.18, p.348-348, 1955.

KLÖTZER, W.T.; LANGE LAND, K. Testing of materials and methods for crown and bridge prosthesis on animals. **SSO Schweizerische Monatsschrift für Zahnheilkunde**, Bern, n.83, p.163-244, 1973.

KELLER, J. C. et al. In vitro attachment of osteoblast-like cells to osteoceramic materials. **Dental Materials**, Kidlington, n.13, p.62-68, Jan 1997.

LANGELAND, L.K et al. Histologic and Clinical Comparisons of Addent with Silicate Cement and Cold-curing Material. **Journal of the America Dental Association**, Chicago, v.72, p.373-385, 1966.

LEE, K. Y. et al. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. **Macromolecules**, Washington, n.33, p.4291-4294, 2000.

MACDONALD, C. Primary culture and the establishment of cell lines. In: DAVIES, J. M. **Basic cell culture**. Oxford: Oxford University Press, 1996. p.148-179.

MAILHOT, J. M.; BORKE, J. L. An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. **Clinical Oral Implants Research**; Copenhagen, v.9, n.1, p.43-50, Feb. 1998.

MALEKZADEH, R. et al. Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.69, p.256-1262, 1998.

MAUNEY, J. R. et al. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. **Tissue Engineering**, New York, v.10, n.1/2, p.81-92, 2004.

MCALLISTER, B. S. et al. Isolation of human osteoblasts-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.69, p.1256-1262, 1998.

MCATEER, J. A.; DAVIS, J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In DAVIES, J. M. **Basic cell culture**. Oxford: Oxford University Press, 1996. p.93-147.

MCKEE, M. D. et al. Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and alpha 2HS-glycoprotein) proteins in rat bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, n.8, p.485-496, 1993.

MEAZZINI, M. C. et al. Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, n.16, p.170-180, 1998.

MEYER, U.; JOOS, U.; WIESMANN, H. P. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. International, **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, n.33, p.325-332, 2004.

MIYAMOTO, I. et al. Enhancement of bone volume in guided bone augmentation by cell transplants derived fro periosteum: an experimental study in rabbit calvarium bone. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, n.15, p.308-314, 2004.

NIEDEN, N. I. Z.; KEMPKA, G.; AHR, H. J. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. **Differentiation: Research in Biological Diversity**, Oxford, v.71, p.18-27, 2003.

PEGO, A. P. et al. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.87, p.69-79, 2003.

PIEPER, J. S. et al. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. **Biomaterials**, Oxford, v.20, p.847-848, 1999.

PINERO, G. J. et al. Bone matrix proteins in osteogenesis and remodeling in the neonatal rat mandible as studied by imunolocatization of osteopontin, bone sialoprotein, 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. **Archives of Oral Biology**, Oxford, n.40, p.145-155, 1995.

REUTHER, T. et al. Morphogenesis and proliferation in mono - and organotypic co-cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and alveolar bone cells. **Cell and Tissue Research**, Belin, n.312, p.189–196, 2003.

ROSA, A. L. et al. Surface topography of Hydroxyapatite affects ROS17/2.8 cells response. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v.16, n.3, p.209-215, 2002.

SCHMALZ, G. Materials science: biological aspects. **Journal of Dental Research**, Alexandria, v.81, n.10, p.660-663, 2002.

SCHOR, N.; BOIM, M.A.; SANTOS, O.F.P. **Bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.85-91.

SCHUSTER, U. et al. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. **Journal of Endodontics**, Baltimore, n.27, p.259–265, 2001.

SEITZER, U. et al. Transforming growth factor beta influences lysyl hydroxylase of collagen i and reduces steady-state levels of lysyl hydroxylase mRNA in human osteoblast-like cells. **European Journal of Clinical Investigation**, .Oxford, n.25, p.959-966, 1995.

SHAPIRO, F. et al. Transmission electron microscopic demonstration of vimentin in rat osteoblast and osteocyte cell bodies and processes using the immunogold technique. **Anatomical Record**, New York, n.241, p.39–48, 1995.

SILVA, M. H. P. et al. In vitro cellular response to titanium eletrochemically coated with hidroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness. **Journal of Materials Sciences**, n.14, p.511-519, 2003.

SKALAK, R.; FOX, C. **Tissue engineering**: proceedings of a workshop held at granlibakken. Lake Tahoe: Allan R. Liss, 1988.

SPRINGER, I. N. G. et al. Particulated bone grafts - effectiveness of bone cell supply. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v.15, n.2, p.205-215, 2004.

STAMMEN, J. A. et al. Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. **Biomaterial**, Oxford, v.22, p.799-806, 2001.

THONEMANN, B.; SCHMALZ, G. Immortalization of bovine dental papilla cells with simian virus 40 large T antigen. **Archives of Oral Biology**, Oxford, n.45, p.857-869, 2000.

UEDA, M. et al. Tissue engineering research in oral implant surgery. **Artificial Organs**, Cambridge, v.25, n.3, p.164-171, 2001.

VACANTI, J. P. Beyond transplantation. **Archives of Surgery**, Chicago, n.123, p.545-549, 1998.

VACANTI, M. D.; CHARLES A.; BONASSAR, L. J. An overview of tissue engineered bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n.367S, p.375-381, 1999.

VAN GRIENSVEN, M. et al. A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue specimens using fibrin glue. **Experimental and Toxicologic Pathology**, New York, v.54, n.1, p.25-29, Jul. 2002.

YANG, X. B. et al. Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. **Bone**, New York, v.29, n.6, p.523-531, Dez. 2001.

YLIHEIKKILÄ, P. K. et al. Correlative microscopic investigation of the interface between titanium alloy and the osteoblast-osteoblast matrix using mineralizing cultures of primary fetal bovine mandibular osteoblasts. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, n.10, p.655-656, 1995.

YOUNG, M. F. et al. Molecular and cellular biology of the major noncollagenous proteins in bone. In: NODA, M. (Ed). **Cellular and molecular biology of bone**. San Diego: Academic Press, 1993. p.191-234.

YOUNG, M. F. Bone matrix proteins more than markers. **Calcified Tissue International**, New York, v.72, n.1, p.2-4, 2003.

ANEXOS E APÊNDICES

METODOLOGIA EXPANDIDA

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da amostra

Obteve-se o material para o cultivo celular de tecido ósseo intra-oral humano. Foram selecionados três pacientes, dois do sexo feminino, com 24 anos e 37 anos. Os dados de anamnese revelaram estado sistêmico normal, não relataram uso de qualquer tipo de medicamento. Tais pacientes tinham indicação de remoção cirúrgica de bloco córtico-esponjoso, para utilização como material de enxerto autógeno, em procedimento regenerativo ósseo intrabucal, sendo utilizado parte desse osso particulado biopsiado na cultura primária. Os pacientes foram submetidos à biópsia de tecido ósseo córtico - esponjoso de região de sínfise da mandíbula, através da utilização de fresas ósseas de implantes do sistema de implantes Bicon™ (Boston, USA), utilizadas com motor elétrico em 50rpm, sob anestesia local, em condições de assepsia e anti-sepsia compatíveis a ambiente ambulatorial (FIG. 01). Antes da realização da cirurgia, os pacientes foram informados sobre o projeto e optaram por participar deste por livre e espontânea vontade, com consentimento informado (protocolo de pesquisa nº 101/2004, aprovado em 26 de abril de 2004, pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina).

Após coleta dos explantes, estes foram lavados em soro fisiológico, à temperatura ambiente, por várias vezes, e colocados em garrafas de cultura celular de 25cm² (FIG. 02), com meio de cultivo Ham F12 (Cultilab, Campinas, Brasil) com antifúngico e antibiótico (Sulfato de Gentamicina (50mg/l) e anfotericina B (2mg/l)), suplementado com 12% de soro fetal bovino (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e transferido para o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC.

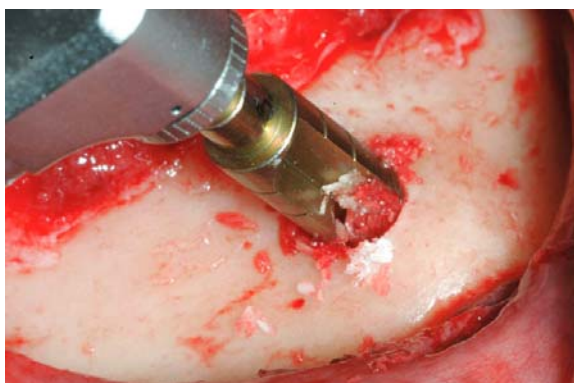


Figura 01 - Coleta de tecido ósseo da região da sínfise da mandíbula

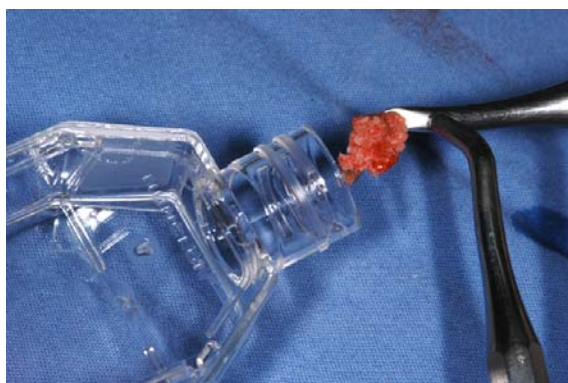


Figura 02 - Explantes sendo colocados nas garrafas de cultura celular

Cultivo primário e estabelecimento de linhagem celular

O protocolo básico adotado foi aquele estabelecido por Freshney, em 1989; variações desse protocolo estão sendo aqui propostas e foram estabelecidas durante o desenvolvimento desta pesquisa, de acordo com as necessidades, dificuldades e oportunidades. Todos os procedimentos para a obtenção do cultivo primário de osteoblastos foram realizados sob capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil), em temperatura ambiente, entre 25°C e 28°C, num laboratório do tipo P2, preparado para manipulação de microorganismos pertencentes ao grupo de

risco 2. Assegurou-se, assim, maior proteção ao pessoal do laboratório com relação à exposição ocasional e inesperada aos microorganismos que manipulam.

A amostra coletada foi lavada com solução de Tyrode, para remover as células gordurosas e sanguíneas. As partículas ósseas separadas foram lavadas com meio Ham F12 com antifúngico e antibiótico (sulfato de Gentamicina (50mg/l) e anfotericina B (2mg/l)), suplementado com 12% de soro fetal bovino (meio completo), e colocadas em uma garrafa de cultura celular pequena (25cm²) estéril, e foram adicionados 4ml da solução de digestão (solução A: 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 0,05g NaH₂PO₄H₂O em 100ml de água destilada; solução B: solução de collagenase-tripsina - foram dissolvidas 137mg de Colágenase tipo I (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e 50mg de tripsina tipo III (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) em 10ml da solução A. O pH foi ajustado em 7,2 e completado para 100ml com água destilada. A água destilada foi esterilizada com filtro e distribuída em alíquotas de 10ml, sendo armazenadas à temperatura de -20°C). Esta solução foi adicionada às garrafas, cobrindo os espécimes ósseos. Agitou-se a solução, em agitador "Hot Rock" modelo RP-50 (Elmeco, USA), à temperatura ambiente, por 30min. Removeu-se a suspensão de células liberadas e estas foram descartadas, tendo em vista que tais células provavelmente continham fibroblastos. Adicionou-se uma segunda alíquota de 4ml da solução de digestão aos fragmentos ósseos e esta foi agitada por 30min, à temperatura ambiente. Foi coletada a solução de digestão dos fragmentos ósseos e realizada centrifugação por 2min a 580g, à temperatura ambiente. Depois de se remove o sobrenadante, as células foram suspendidas em 4ml do meio Ham F12, com antifúngico e antibiótico (Sulfato de Gentamicina (50mg/l) e anfotericina B (2mg/l)), suplementado com 20% de soro fetal bovino. Foi realizada centrifugação à 580g, por 10min e as células foram ressuspendidas em 4ml do meio completo e

colocado em garrafas de 25cm². No ínterim, foi adicionada uma solução de digestão adicional de 4ml aos fragmentos de osso remanescentes e repetiu-se a digestão por 30min; as células liberadas foram colhidas.

As garrafas foram posteriormente deixadas na posição horizontal, em estufa, 5% CO₂ (Nuaire™ US Autoflow CO2 Water Jacketed Incubator, EUA), 37°C, por 5-7 dias; durante esse período, foi checado o crescimento celular, utilizando-se microscópio de fase invertida (40x a 200x, Olympus, Japão). Conforme necessário, o meio das garrafas foi substituído por meio completo fresco, (em torno de duas vezes por semana). A mudança de meio de cultivo foi realizada a partir da observação de alteração da coloração deste, indicando atividade metabólica celular, alteração de pH e conseqüente necessidade de troca do meio.

Quando atingiu-se a subconfluência de aproximadamente 80% foi atingida, o tapete celular foi tripsinizado, com tripsina a 0,25% (tripsina: EDTA 1: 250), para obter individualização celular, e essa cultura primária foi subcultivada, através de separação de 1:1, para passagens subseqüentes, sendo separadas alíquotas para congelamento das células. Neste momento se estabeleceu a linhagem celular, a partir da cultura primária dos três pacientes selecionados. A confluência dos cultivos celulares foi verificada em microscópio de luz, quando se observou se a superfície do frasco estava ou não recoberta por uma monocamada contínua de células.

Congelamento e descongelamento celular

Quando da ressuspensão celular, ao invés de depositá-las no frasco para crescimento, cada 1ml de suspensão celular será colocado em um criotubo, previamente identificado e datado.

Os protocolos de congelamento e descongelamento adotados serão aqueles elaborados por Juliane Araújo Greinert, revisado por Ryane L. Hess e aprovados pela professora Cláudia M^a. Simões, em 15/07/99, utilizados no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC. Os passos são os seguintes:

– Congelamento de células:

1. preparar previamente o meio para congelamento em banho de gelo:

5ml de meio de crescimento	}	USAR 1,8ml por criotubo
4ml de SFB (40%)		
1ml de DMSO (10%)		

ATENÇÃO: Dimetilsulfóxido (DMSO) é tóxico e altamente inflamável

2. lavar o tapete celular 3x com PBS (10ml);
3. filtrar 2 ependorffs de tripsina;
4. tripsinizar as células, controlando o descolamento das células pelo microscópio e/ou a “olho nu” contra a luz;

5. adicionar 10ml de meio de crescimento suplementado com 10% SFB + 1% PSA 199 sem soro fetal;
 6. transferir a suspensão celular para o tubo de centrifuga;
 7. centrifugar no estágio 2 (1000rpm) por 3min-5min;
 8. aspirar o meio (descarte), com muito cuidado para não aspirar as células do fundo do tubo;
 9. adicionar rapidamente no tubo de 15ml, 3,6ml de solução de congelamento, homogeneizar e transferir para um criotubo (1,8ml cada a ser realizado em banho de gelo), imediatamente levado ao freezer - 80°C;
- OBS.: Deve-se identificar completamente a linhagem celular, passagem, manipulador, data e presença de PSA no criotubo
- 10.colocar os criotubos nos Mr. Frozen®, não esquecendo de checar o nível de álcool etílico 96°GL;
 - 11.colocar o Mr Frozen® no freezer –80°C, no mínimo, por 12h, e no máximo por 24h;
 - 12.transferir para o *container* de nitrogênio líquido, anotando o canister e a vareta em que for armazenado o criotubo, no caderno destinado para tal.

- Descongelamento de células:
 1. escolher um criotubo de células armazenado no nitrogênio;
 2. para essa escolha, olhar no caderno o local (canister e vareta) em que se encontra o criotubo com as células desejadas;
 3. apagar do caderno o local do criotubo retirado;
 4. descongelar o criotubo em temperatura ambiente;
 5. centrifugar o criotubo em velocidade de 1000rpm (2) por 2min. Desprezar o sobrenadante e ressuspender as células em meio de crescimento suplementado + 10% SFB E 1% PSA;
 6. colocar todo o conteúdo do microtubo em uma garrafa pequena destinada ao cultivo das células;
 7. adicionar o mesmo meio de crescimento: meio de cultura + PSA 1% + SFB: $\pm 25\text{ml}$ para garrafas grandes e $\pm 10\text{ml}$ para garrafas pequenas;
 8. incubar a 37°C em estufa de CO_2 a 5% por 1h;
 9. durante o tempo de incubação as células formarão tapete. Após esse período, retirar cuidadosamente o meio presente e adicionar uma nova quantidade do meio de crescimento;
 10. colocar novamente na estufa de CO_2 .

Acompanhamento do crescimento, proliferação celular e aspecto morfológico

As células cultivadas foram observadas, monitoradas e fotografadas (100X e 400X) em microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK 40) a cada três dias, com posterior trocas de meio. As imagens foram analisadas, para acompanhamento das características morfológicas das células, até que estas atingissem estágio de subconfluência, no qual foram feitas as tripsinizações e respectivas passagens. As células foram fotografadas em cultura primária e secundária e comparadas com os dados obtidos da literatura.

Caracterização fenotípica da linhagem estabelecida

Os experimentos realizaram-se nas linhagens estabelecidas, em primeira passagem (P1). O fenótipo osteoblástico das células cultivadas foi confirmado através da demonstração da expressão da OPN, OCN, ALP e COL I. RT-PCR do cDNA isolado das células cultivadas foram executados utilizando *primers* específicos e os sinais foram comparados com um controle positivo (tecido ósseo humano) e um controle negativo (fibroblastos de gengiva humana).

Extração de RNAs totais

As células foram cultivadas até semiconfluência. Após esse período, o meio de cultura foi removido e os RNAs totais foram extraídos utilizando reagente TRIzol™ (Invitrogen, USA), de acordo orientações do fabricante. A concentração dos RNAs totais foi estimada por espectrofotometria a 260nm.

Síntese do cDNA

A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir de 1µg do RNA total, obtido pela extração com o TRIzol™, utilizando um *kit* para transcrição reversa ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen,USA), conforme especificações do fabricante.

Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Para a RT-PCR o cDNA foi diluído 1:5, sendo então utilizado 2µl do cDNA diluído, em uma reação de 25µl, utilizando-se 1 unidade de enzima DNA polimerase. A amplificação ocorreu em 30 ciclos (desnaturação a 94°C por 1min; anelamento a 58°C por 1min e extensão a 72°C por 1,5min) com uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 2min e uma etapa final de extensão 72°C por 7min. O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose a 2% (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) corado com brometo de etídeo (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) e

fotografado em sistema digital de análise de imagem (EDAS290 Kodak). Como controle negativo foram utilizados fibroblastos humanos, obtidos de cultura primária de tecido gengival.

Os *primers* utilizados foram obtidos de seqüências de mRNA humanos de fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I e Vimentina disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências escolhidas (QUADRO. 01) foram testadas através do programa de análise de *primers* Oligo-6™ e adquiridas da Invitrogen (Invitrogen, USA). Foram feitas 2 repetições em cada linhagem estabelecida.

	Sense	Anti-sense	Produto Esperado
Osteopontina	5'-CTA GGC ATC ACC TGT GCC ATA CC-3'	5'-CAG TGA CCA GTT CAT CAG ATT CAT C-3'	372pb
Osteocalcina	5'-ATG AGA GCC CTC ACA CTC CTC-3'	5'-GCC GTA GAA GCG CCG ATA GGC-3'	293pb
Colágeno tipo 1	5'-GGA CAC AAT GGA TTG CAA GG-3'	5'-TAA CCA CTG CTC CAC TCT GG-3'	460pb
Fosfatase Alcalina	5'-CCC AAA GGC TTC TTC TTG-3'	5'-CTG GTA GTT GTT GTG AGC-3'	356pb
Vimentina	5'-CCC TCA CCT GTG AAG TGG AT -3'	5'-CTC AAT GTC AAG GGC CAT CT -3'	672pb

Quadro 01 - Seqüência dos primers utilizados

Ensaio de mineralização

Osteoblastos foram cultivados, em primeira passagem, em placas de cultura de 24 cavidades, em densidade de 2×10^4 células/cavidade em meio completo de cultura. As mesmas foram mantidas por um dia, somente em meio, para aderência

das mesmas (designado dia 0), quando passaram a ser cultivadas em meio de mineralização (meio completo, 100 μ g/ml de ácido ascórbico (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) e 10mM de β -glycerofosfato (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA)). Trocou-se o meio de mineralização foi trocado nos dias 2, 5, 8 e 10 e a revelação dos nódulos de mineralização determinados no dia 12 através da técnica de coloração de Von Kossa para avaliação de fosfato, conforme o protocolo descrito: as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas em paraformaldeído (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 4% por 20min, lavadas uma vez com água e serialmente desidratadas em EtOH a 70%, 95%, e 100%, duas vezes cada e secadas pelo ar. As placas foram então reidratadas com EtOH a 100% para 95% para 80% para água. A água foi removida, uma solução de nitrato de prata a 2% (Odontofarma, Londrina, Brasil) foi adicionada e a placa foi exposta ao sol, por 20min, e depois foi lavada com água. Uma solução de tiosulfato de sódio a 5% (Odontofarma, Londrina, Brasil) foi adicionado, por 3min, as placas foram lavadas com água, depois desidratadas com EtOH a 95%, por duas vezes, desidratadas com EtOH a 100%, por duas vezes, depois do que foram secas para análise das imagens (Bonewald et al.,2003). Os nódulos de mineralização foram observados através de microscopia de luz e de contraste de fase (microscópio Olympus modelo CK 40), em campo claro. Obtiveram-se as imagens através de máquina digital Olympus modelo C-5060, em aumentos de 100 X e 400 X. Foram feitas três repetições em cada linhagem estabelecida.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Alberto João Zortéa Junior, aluno do programa de doutorado em Odontologia, área de concentração em Implantodontia, e estou desenvolvendo a pesquisa Isolamento e Cultivo *in vitro* de osteoblastos humanos derivados da cavidade oral, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini, com o objetivo de cultivar células do tecido ósseo humano. Este estudo é necessário porque o cultivo de células ósseas é usualmente realizado em ratos, que possuem diferenças significativas quando comparadas com as células ósseas humanas; várias pesquisas poderão ser realizadas com o cultivo destas células, diminuindo a necessidade de pesquisas e sacrifícios de animais, além de diminuir a necessidade da realização de pesquisas em seres humanos. Para a realização desta será necessária a retirada de uma porção de aproximadamente 2mm² de tecido ósseo, quando da indicação e realização de outra cirurgia óssea em área vizinha. Isto não traz riscos, podendo ocorrer algum desconforto pós-cirúrgico, semelhante à extração de um dente; esperamos que esta pesquisa traga vários benefícios para a sociedade, na reconstrução de perdas ósseas que eventualmente ocorrem nas diferentes regiões do corpo humano, quando da presença de algumas doenças, ou em caso de acidentes. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3331-9077. Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais (ou material coletado) e só serão utilizados neste trabalho.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Eu, _____, fui esclarecido sobre a pesquisa Isolamento e Cultivo *in vitro* de osteoblastos humanos derivados da cavidade oral e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, _____ de _____ de 2004.

Assinatura: _____ RG: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA COM SERES HUMANOS

Parecer Consustânciado Projeto nº 101/2004

I – Identificação

Título do Projeto: Isolamento e Cultivo *in vivo* de Osteoblastos Derivados da Cavidade Bucal.

Pesquisador Responsável: Ricardo de Souza Magini

Pesquisador Principal: Alberto João Zortéa Junior.

Propósito do projeto: doutorado.

Instituição onde se realizará: Ufsc (CEPI/Laboratório de Virologia Aplicada/CCAS)

Data de assintatura: 06/04/2004

II – Objetivos: Geral – Estabelece4r um protocolo de cultura *in vivo* de células humanas de osteoblastos, oriundas da cavidade oral de um indivíduo saudável;

– Estabelecer uma imagem celular, a partir do cultivo primário de osteoblastos de tecido ósseo humano, oriundo da cavidade oral, de um indivíduo saudável.

Específicos – Autenticar os osteoblastos oriundos de um indivíduo saudável para confirmar sua identidade após seu isolamento e cultivo *in vitro* através da:

- análise da atividade enzimática da fosfatase alcalina;
- identificação celular através dos antígenos para osteonectina e osteocalcinina;
- identificação da expressão do colágeno tipo I;
- determinação da habilidade das células em produzirem calcificações;
- avaliar, nos osteoblastos, oriundos de um indivíduo saudável, após seu isolamento e cultivo *in vivo*;
- sua viabilidade celular, através de contagem de células viáveis, com utilização do corante de Azul de Trypan;
- Possíveis alterações no DNA celular, através do Ensaio do Cometa.

III – Sumário do Projeto: Será selecionado um(a) paciente, com idade entre 18 e 40 anos, para a obtenção do material para o cultivo de tecido ósseo humano quando houver indicação de remoção cirúrgica de bloco cortiço-esponjoso. O paciente não deve relatar o uso de nenhum medicamento e também ter um estado sistêmico normal. Esse material será tratado adequadamente para a consecussão dos objetivos propostos.

IV – Comentários: Trata-se de um projeto bem escrito, adequadamente delineado e cujos autores estão escudados em currículos que mostram a competência para a empreitada. Sua relevância está bem estabelecida no projeto e a documentação apresentada está completa, necessitando apenas uma adquação no que concerne ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que precisa assegurar tão somente que o material coletado será empregado apenas nessa pesquisa.

V – Parecer: Pelo exposto, somos de parecer que este Comitê aprove o presente projeto, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Aprovado (x)

Aprovado “ad referendum” ()

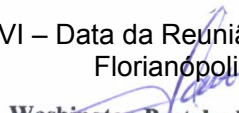
Aprovado e encaminhado ao CONEP ()

Com pendências ()

Reprovado (0

VI – Data da Reunião

Florianópolis, 26 de Abril de 2004


Washington Portela de Souza
 Coordenador em exercício CEPESH

RELAÇÃO DE OUTROS TRABALHOS PUBLICADOS OU ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O DOUTORADO

MAGINI R, S.; SCHIOCHETT, C.; FERREIRA, C.F.; COURA, G.S.; ZORTÉA, A.J. Analysis of Tissue behavior Around Bovine Bone Screw Placed in Rabbit Tibia. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, n.18, p.615, 2004.

COURA, G.S.; ZORTÉA JR., A.J.; SAVI, L.A.; SIMÕES, C.M.O.; MAGINI, R.S. protocolo preliminar de cultura de fibroblastos gengivais humanos. **Rev Bras Implantodont Prótese Implant.**, v.12, n.47-48, p.190-196, 2005.

CARMO FILHO, L.C.; ZORTÉA JR., A.J.; COURA, G.S.; FRANZON FILHO, P.R. Análise de osseointegração primária de 369 implantes osseointegráveis do sistema neodent. **Rev Bras Implantodont Prótese Implant.**, v.12, n.47-48, p.206-214, 2005.

ZORTÉA JR., A.J.; COURA, G.S.; SAVI, L.A.; MAGINI, R.S.; SIMÕES, C.M.O. Isolamento e cultivo in vitro de fibroblastos humanos derivados da cavidade bucal-projeto piloto. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, n.2, p.256, 2003. [Suplemento].

COURA, G.S.; ZORTÉA JR., A.J.; SAVI, L.A.; MAGINI, R.S.; SIMÕES, C.M.O. Initial protocol of human gingival fibroblast culture cell viability and cellular damage. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.** 2004. Spec Issue 19th Annual Meeting of the Academy of Osseointegration.

CASTRO, K.N.; ZORTÉA JR., A.J.; MAGINI, R.S.; SOUZA, D.C.; FREIRE, J.N. Implant placement in posterior maxilla with and without sinus lift augmentation: Seven year retrospective Analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2003. Spec Issue 18th Annual Meeting of the Academy of Osseointegration.

ZORTÉA JR., A.J.; CASTRO, K.N.; MAGINI, R.S.; VIEIRA, S.; SOUZA, D.C. Variables associated to osseointegrated implant failure: seven year retrospective analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.** 2003. Spec Issue 18th Annual Meeting of the Academy of Osseointegration.

MAGNANI, O.; ZORTÉA JR, A.J.; FERREIRA, C.F.; MAGINI, R.S.; COURA, G.S. Retrospective analysis of implants placed in areas with and without bone grafts. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.** 2003. Spec Issue 18th Annual Meeting of the Academy of Osseointegration.

ZORTÉA JR., A.J.; VIEIRA, S.; MARTINS, A.P. Variáveis associadas ao fracasso de implantes osseointegrados orais. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, n.16, p.258, 2002. [Suplemento].

ZORTÉA JR., A.J.; MAGINI, R.S.; COURA, G.S.; FERREIRA, C.F.; FREIRE, J.N.; CASTRO, K.N. Clustering phenomena in implant dentistry: 7- year retrospective follow-up. **J. Dent. Res.**, 2003. [Spec Issue].

ZORTÉA JR., A.J.; MAGINI, R.S.; FREITAS, S.F.T.; CALVO, M.C.M.; COURA, G.S.; CASTRO, K.N. Cluster assignments and multivariate analysis in implant dentistry. **J. Dent. Res.**, 2004. [Spec Issue].

Capítulos de Livros:

ZORTÉA JR., A.J.; MAGINI, R. S. **Acidentes e complicações associadas ao enxerto ósseo** In: **Enxerto ósseo em seio maxilar no seio maxilar**. São Paulo: Editora e Livraria Santos, 2005.

MAGINI, R.S.; ZORTÉA JR., A.J.; COURA, G.S.; SAVI, L.A.; SIMÕES, C.M.O. Engenharia tecidual-cultura de células. In: **Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento**. São Paulo: Editora e Livraria Santos, 2003.

MAGINI, R.; ZORTÉA, A.J.; FREIRE, J. N. O.; PONTUAL, M. A. B.; BIANCHINI, M. A. Inéditos desenvolvimentos para a implantodontia. In: **4º Simposio Internacional de Prótese sobre Implante**, São Paulo, 2003.

MAGINI, R. S.; ZORTÉA JR., A.J.; BENFATTI, C.; COURA, G.S.; ARAÚJO, M.A.R.; CASTRO, K.N.; FERREIRA, C.F. Bioengenharia aplicada á implantodontia. In: **Implantodontia contemporânea: cirurgia e prótese**. São Paulo: Ed. Artes Medicas, 2005.

Trabalhos encaminhados para Publicação:

BALAROTTI, P.; ZORTÉA JR., A.J.; COURA, G.S.; PRADO, E.S. **Análise de sucesso de 37 implantes submetidos à imediata**: estudo retrospectivo de 16 meses. Encaminhado para Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes em setembro de 2005.

MARTIN, L.F.M.; ZORTÉA JR., A.J.; FRANZON FILHO, P.R.; DEMCHUK, C.A.R.L. **Plasma rico em plaquetas em enxertia óssea do seio maxilar**: revisão da literatura. Encaminhado para Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes em outubro de 2005.

GONÇALVES, D.V.; COURA, G.S.; DEMCHUK, C.A.R.L.; ZORTÉA JR., A.J. **considerações atuais sobre biossegurança em bancos de osso no Brasil.** Encaminhado para Revista Implante News em outubro de 2005.

IVANAGA, C.A.; FRANZON FILHO, P.R.; ZORTÉA JR., A.J.; OGUIDO, K. **Análise de osseointegração primária do sistema de implantes conexão:** estudo retrospectivo de 20 meses. Encaminhado para Revista Implante News em novembro de 2005.

MOTTA, M. S.; PRADO, E.C.S.; CORDIOLI, M.A.G.; ZORTÉA JR., A.J. **Tratamento de perda óssea ocasionada por periimplantite, utilizando Regeneração Óssea Guiada (ROG):** revisão de literatura. Encaminhado para Revista Internacional de Periodontia Clínica em setembro de 2005.

COURA, G.S.; ZORTÉA JR., A.J.; SAVI, L.A.; MAGINI, R.S.; SIMÕES, C.M.O. **Protocol of human gingival fibroblast culture.** evaluation of cell viability and potential DNA cellular damage. Encaminhado para Brazilian Dental Journal em fevereiro de 2006.